

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO  
HIDROETANÓLICO DE *Eugenia uniflora* L. (PITANGUEIRA) -  
ANÁLISE DO EFEITO RELAXANTE EM AORTA TORÁCICA  
ISOLADA DE RATO.

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial à obtenção do  
título de Mestre em Farmacologia.

Prof<sup>a</sup> Orientadora: Dr<sup>a</sup> Rosa Maria  
Ribeiro do Valle Nicolau

ELISABETH WAZLAWIK

Florianópolis  
1996

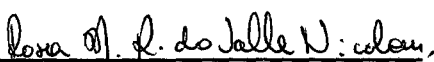
**"AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO  
HIDROETANÓLICO DE *Eugenia uniflora* L. (pitangueira) - ANÁLISE DO  
EFEITO RELAXANTE EM AORTA TORÁCICA ISOLADA DE RATO"**


POR


**ELISABETH WAZLAWIK**


Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

  
Rosa M.R. do Vale Nicolau (FMC/UFSC-Orientadora)

  
Maria Cristina O. Salgado (UFRP/SP-Membro Titular)

  
Cláudia M. Oliveira Simões (CIF/UFSC-Membro Titular)

  
Prof. João Batista Calixto  
Coordenador do Curso de Pós-Graduação  
em farmacologia, em exercício

Florianópolis, agosto de 1996.

***Aos meus pais, Walter e Ignez, ao Afonso e  
à tia Ilse, com um agradecimento especial pelo  
amor, amizade, incentivo e constante apoio.***

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau, o meu especial agradecimento pela sua orientação, amizade, e por propiciar integração com a área da Nutrição.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, em especial aos Doutores Giles Alexander Rae, João Batista Calixto e Yara dos Santos Medeiros, pela colaboração e sugestões.

À Elza Bernardini Ramos, pelo auxílio, ensinamentos técnicos, e amizade.

Aos demais funcionários do Departamento de Farmacologia, pelo auxílio e amizade, em especial à Adenir Pereira, Rosana Ostrosky e Pedro Paulo de Souza.

À Josane Reischl e Terezinha Fazzioni, pela amizade e assessoria.

À Profª Ana Zanin, do Departamento de Botânica, pela classificação botânica da *Eugenia uniflora* L.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, pelas excelentes sugestões.

Às Professoras Doutoradas Cláudia M. de Oliveira Simões e Marení Rocha Farias, pelas sugestões e pela oportunidade de trabalho conjunto com o Departamento de Ciências Farmacêuticas.

Ao Químico João Francisco Gomes Correia, pelo fracionamento e isolamento dos constituintes fitoquímicos e pela troca de informações.

Ao Marco Antônio da Silva e Rodrigo Rebello Peters, pela amizade, excelente clima de trabalho, auxílio e troca de informações.

À Profª Drª Marta Pasqualini, pelas informações referentes à indução do diabetes e experimentos com ratos diabéticos.

À Profª Drª Isis do Carmo Kettelhut, pela amistosa acolhida e por propiciar estágio no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, sob sua supervisão, bem como aos alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial ao José Roberto Oliveira, pelas orientações técnicas e auxílio durante o meu estágio.

À Profª Drª Maria Cristina O. Salgado, pelas sugestões e por oportunizar a integração com o grupo de trabalho do laboratório do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, e ao Osmar Vettore, por inteirar-me nas técnicas desenvolvidas naquele laboratório, por ocasião de minha estada em Ribeirão Preto.

À Ana Rita dos Santos Lopes, Itamar Domingos e Marcellus Reis, por me transmitirem as primeiras noções sobre diferentes procedimentos técnicos de pesquisa e pela amizade.

À Marlene Zannin e Valfredo Schlemper, por orientarem o meu estudo, quando eu nada conhecia sobre Farmacologia e estava me preparando para prestar a prova de seleção para ingresso no curso de Mestrado, e pela amizade.

Aos colegas e amigos do Departamento de Nutrição, CCS-UFSC, em especial às Doutoradas Emília Addison M. Moreira e Regina L. M. Fagundes, e à Profª Sônia Maria de Medeiros Batista.

Aos colegas da Farmacologia, e em especial aos da turma: Alcíbia, Daniela, José Geraldo, Monique, Orlando e Zulma, pela amizade e troca de informações.

Aos colegas de iniciação científica e estagiários do grupo de trabalho que fizemos parte, pelo convívio e troca de informações.

Aos familiares, aos amigos e a todas as pessoas não mencionadas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, pela força transmitida.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. <i>Eugenia uniflora</i> L.....	1
1.2. Regulação do tônus vascular pelo endotélio .....	5
1.3. Vias do óxido nítrico e endotélio.....	7
1.4. Implicações fisiopatológicas da alteração da via do óxido nítrico no endotélio.....	10
1.5. Constituintes fitoquímicos e proteção tissular.....	14
1.6. Proposta de trabalho .....	17
2. OBJETIVOS .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1. Animais .....	20
3.2. Material botânico .....	20
3.3. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico.....	21
3.4. Análise química .....	21
3.4.1. Partição do EBHA.....	21
3.4.2. Estudo fitoquímico preliminar .....	22
3.4.3. Análise química das frações AcOEt e aquosa .....	22
3.5. Análise farmacológica.....	23
3.5.1. Avaliação da atividade hipoglicemiante.....	23
3.5.1.1. Indução do diabetes.....	23
3.5.1.2. Administração do EBHA.....	23
3.5.1.3. Parâmetros bioquímicos e fisiológicos avaliados.....	24
3.5.2. Experimentos realizados com musculatura lisa não-vascular.....	24
3.5.2.1. Íleo isolado de cobaia .....	24
3.5.2.2. Útero isolado de rata .....	25
3.5.2.3. Ducto deferente isolado de rato .....	26
3.5.3. Experimentos realizados com musculatura lisa vascular.....	27
3.5.3.1. Anel de aorta torácica isolada de rato .....	27
3.6. Apresentação dos resultados e análise estatística.....	31
3.7. Drogas e reagentes.....	32

4. RESULTADOS .....	33
4.1. Estudo fitoquímico do EBHA de <i>E. uniflora</i> , das suas frações e isolamento de seus constituintes químicos .....	33
4.2. Análise farmacológica .....	37
4.2.1. Atividade hipoglicemiante do EBHA de <i>E. uniflora</i> .....	37
4.2.2. Atividade inibitória do EBHA de <i>E. uniflora</i> em preparações de musculatura lisa isolada .....	43
4.2.3. Análise da resposta relaxante da aorta torácica isolada de rato, previamente contraída com noradrenalina ou K <sup>+</sup> ao EBHA de <i>E. uniflora</i> .....	52
4.2.4. Influência da exposição prévia ao EBHA de <i>E. uniflora</i> no relaxamento da aorta torácica isolada de rato .....	55
4.2.5. Possível participação da via do óxido nítrico sobre a resposta relaxante da aorta torácica isolada de rato ao EBHA de <i>E. uniflora</i> .....	57
4.2.6. Estudo de outras drogas sobre o efeito relaxante do EBHA de <i>E. uniflora</i> em aorta torácica isolada de rato .....	63
4.2.7. Resposta relaxante da aorta torácica isolada de rato às frações aquosa e acetato de etila do EBHA de <i>E. uniflora</i> .....	69
5. DISCUSSÃO .....	71
RESUMO E CONCLUSÕES .....	87
SUMMARY AND CONCLUSIONS .....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela I</b> - Abordagem fitoquímica preliminar do EBHA e frações de <i>E. uniflora</i> .....	34
<b>Tabela II</b> - Efeito da administração diária do EBHA de <i>E. uniflora</i> (100 mg/kg, 2 vezes ao dia) sobre a glicemia (mg/dL) de ratos normais ou diabéticos (estreptozotocina, 30 mg/kg) .....	40
<b>Tabela III</b> - Efeito da administração diária do EBHA de <i>E. uniflora</i> (100 mg/kg, 2 vezes ao dia) sobre o peso corporal (g) de ratos normais ou diabéticos (estreptozotocina, 30 mg/kg) .....	42
<b>Tabela IV</b> - Efeito do EBHA de <i>E. uniflora</i> (50-400 µg/mL) sobre as respostas contráteis à acetilcolina e à histamina no íleo isolado de cobaia .....	46
<b>Tabela V</b> - Efeito do EBHA de <i>E. uniflora</i> (100-400 µg/mL) sobre as respostas contráteis à acetilcolina e à ocitocina no útero isolado de rata .....	48
<b>Tabela VI</b> - Efeito do EBHA de <i>E. uniflora</i> (30-800 µg/mL) sobre as respostas contráteis à noradrenalina no ducto deferente e anéis de aorta torácica com endotélio, isolados de rato .....	50
<b>Tabela VII</b> - Efeito inibitório do EBHA de <i>E. uniflora</i> em preparações de musculatura lisa isolada .....	51
<b>Tabela VIII</b> - Efeitos de diferentes drogas sobre o relaxamento induzido pelo EBHA de <i>E. uniflora</i> na aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro .....	68
<b>Figura 1</b> - <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	3
<b>Figura 2</b> - Efeito da administração diária do EBHA de <i>E. uniflora</i> sobre a glicemia de ratos normais ou diabéticos .....	39
<b>Figura 3</b> - Efeito da administração diária do EBHA de <i>E. uniflora</i> sobre o peso corporal de ratos normais e diabéticos .....	41



<b>Figura 4</b> - Curvas concentração-efeito médias obtidas pelo método cumulativo à acetilcolina e à histamina na ausência ou presença de concentrações crescentes do EBHA de <i>E. uniflora</i> no íleo isolado de cobaia .....	45
<b>Figura 5</b> - Curvas concentração-efeito médias obtidas pelo método cumulativo à acetilcolina e à ocitocina, na ausência ou presença de concentrações crescentes do EBHA de <i>E. uniflora</i> no útero isolado de rata .....	47
<b>Figura 6</b> - Curvas concentração-efeito médias obtidas pelo método cumulativo à noradrenalina, na ausência e presença de concentrações crescentes do EBHA de <i>E. uniflora</i> no ducto deferente e na aorta torácica isolados de rato.....	49
<b>Figura 7</b> - Registros experimentais típicos ilustrando: relaxamento induzido pelo EBHA de <i>E. uniflora</i> em preparações de aorta torácica de rato ou de útero isolado de rata.....	53
<b>Figura 8</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> em anéis de aorta torácica isolada de rato contraídos previamente com noradrenalina .....	54
<b>Figura 9</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, decorridos 30 min, 2 ou 4 h após a primeira curva.....	56
<b>Figura 10</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> e à acetilcolina em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, na ausência e presença de L-NOARG .....	59
<b>Figura 11</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> e à acetilcolina em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, na ausência e presença de L-NAME .....	60
<b>Figura 12</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> e à acetilcolina em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio, na ausência e presença de L-NMMA.....	61
<b>Figura 13</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> em anéis de aorta torácica isolada de rato, na ausência e presença de azul de metileno.....	62

<b>Figura 14</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> e à acetilcolina em anéis de aorta torácica de rato com endotélio, na ausência e presença de atropina. ....	65
<b>Figura 15</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> em anéis de aorta torácica de rato com endotélio, na ausência e na presença de apamina, glibenclamida e tetraetilamônio .....	66
<b>Figura 16</b> - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de <i>E. uniflora</i> em anéis de aorta torácica de rato com endotélio, na ausência e na presença de: pirilamina, propranolol e indometacina.....	67
<b>Figura 17</b> - Curvas concentração-relaxamento médias para concentrações crescentes das frações aquosa e acetato de etila, em anéis de aorta torácica isolada de rato, com endotélio íntegro .....	70

## 1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido observado um retorno à utilização de terapias alternativas, incluindo a fitoterapia, como complemento ou substituto dos tratamentos convencionais, podendo a isto estar ou não associados fatores sócio-econômicos e culturais.

O reino vegetal constitui um verdadeiro arsenal terapêutico, de onde já foram extraídos fármacos reconhecidamente eficazes e seguros como, por exemplo, morfina, codeína, digoxina, quinidina, ergometrina, reserpina, vincristina, artemisina, taxol, entre outros. No entanto, na imensidão da flora brasileira, há um número incontável de plantas que necessitam de estudos científicos para que possam ser usadas de forma racional, com eficácia e segurança. Muitas vezes, certas plantas medicinais consideradas benéficas e mesmo “milagrosas”, podem tornar-se motivo de sérias preocupações, devido a seus efeitos adversos ou tóxicos, advindos mesmo do seu uso racional ou indiscriminado.

### 1.1. *Eugenia uniflora* L.

A planta *Eugenia uniflora* L. (= *Stenocalyx michelii* Berg.), da família Myrtaceae, é uma espécie nativa do Brasil, frequentemente cultivada nos trópicos e subtropicais (Adebajo *et al.*, 1989; Neves e Donato, 1989), sendo denominada popularmente de pitangueira.

A *Eugenia uniflora* L. (*E. uniflora*) é um arbusto ramificado, às vezes arvoreta, de tronco tortuoso, apresentando em torno de três metros de altura, podendo atingir valores superiores (Simões *et al.*, 1986; Neves e Donato, 1989). Suas folhas são simples, opostas, oval-lanceoladas, de até 7 cm de comprimento e 3 cm de largura, curto-pecioladas, glabras, geralmente brilhantes; as folhas jovens são avermelhadas. As flores são brancas, hermafroditas, diclamídeas, tetrâmeras, actinomorfas, com pétalas delicadas e estames vistosos. O fruto conhecido como pitanga é comestível e também utilizado na forma de suco, doces, licor e vinho; é carnoso, de cor vermelho-alaranjada a vermelho-escura, apresenta geralmente oito costelas, com uma ou duas sementes branco-cremosas (Simões *et al.*, 1986) (Figura 1).

A medicina popular preconiza a infusão ou o decocto das folhas como anti-reumático, antifebril, antidiarréico, diurético, hipoglicemiante, hipocolesteremiante (Pio-Corrêa, 1984; Simões *et al.*, 1986), ou ainda como anti-hipertensivo e para perda de peso (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1987; Ferro *et al.*, 1988).



**Folhas e inflorescências**



**Arbusto**



**Frutos**

**Figura 1 - *Eugenia uniflora* L.**

A análise fitoquímica das folhas de *E. uniflora* demonstrou a presença de triterpenos, álcoois de cadeia longa (Rücker *et al.*, 1977) e flavonóides (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1987). Weyerstahl *et al.* (1988) e Henriques *et al.* (1993) também investigaram o óleo essencial das folhas, sendo seus principais constituintes sesquiterpenos bicíclicos do grupo selineno. Além disso, a triagem fitoquímica preliminar das folhas demonstrou a presença de taninos e antraquinonas (Alice *et al.*, 1991). Rücker *et al.* (1977) identificaram, no óleo essencial dos frutos, o sesquiterpeno furanoelemento, o  $\beta$ -germacreno, o  $\gamma$ -elemento e o selino-4(14), 7(11)-dieno.

Quanto às propriedades farmacológicas do extrato das folhas de *E. uniflora*, foi observado um efeito inibitório da atividade da enzima xantino-oxidase (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1987; Theoduloz *et al.*, 1988) e uma atividade sobre o metabolismo lipídico de macacos *Cebus apella* (Ferro *et al.*, 1988). Schapoval *et al.* (1994) verificaram que a infusão de folhas frescas, administrada via oral em ratos, uma hora antes da injeção subplantar de carragenina, ocasionou um efeito anti-edematogênico significativo e, em camundongos, aumentou o tempo de sono induzido pelo pentobarbital. Os mesmos autores ainda demonstraram que a administração do decocto das folhas reduziu o trânsito intestinal em camundongos.

## 1.2. Regulação do tônus vascular pelo endotélio

Furchgott e Zawadzki (1980) descobriram que, em artérias isoladas, o efeito relaxante da acetilcolina (ACh) é dependente da presença de células endoteliais na superfície interna dos vasos. Esse efeito foi atribuído ao fato de que a ACh, interagindo com receptores muscarínicos nessas células, leva à liberação de fator(es) que, difundindo-se às células musculares lisas subjacentes, ativam um mecanismo para o seu relaxamento (Furchgott, 1984). Posteriormente, o fator relaxante derivado do endotélio (FRDE) foi identificado como sendo o próprio óxido nítrico (NO) (Palmer *et al.* 1987), ou uma molécula capaz de liberá-lo (Fukuto e Chaudhuri, 1995). Além disso, a ação relaxante dependente de endotélio de vários agonistas no músculo liso vascular (Moncada *et al.* 1988; Furchgott e Vanhoutte, 1989; Marín e Sánchez-Ferrer, 1990) também parece estar relacionada a aumentos nos níveis do 3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), nas células musculares lisas (Rapoport *et al.*, 1983; Fiscus, 1988; Bennett *et al.*, 1994; Inoue *et al.* 1995).

É considerado que além do NO, ocorra, em várias espécies, também a interferência de um fator hiperpolarizante, com propriedade relaxante. Nas artérias coronarianas humanas, além do NO (Harrison, 1995), estão envolvidos múltiplos fatores relaxantes, entre eles o fator hiperpolarizante dependente de endotélio (FHDE) (Feletou e Vanhoutte, 1988), e um prostanóide (Garland *et al.*, 1995). É sugerido que a liberação do FHDE seja mediada por receptores muscarínicos M<sub>1</sub>

e o de FRDE por receptores  $M_2$ . Já o relaxamento dependente de endotélio em grandes artérias coronarianas seria mediado por receptores  $M_3$  (Garland *et al.*, 1995). De Mey e Vanhoutte (1982) relataram que, em preparações isoladas de veias sistêmicas, o relaxamento dependente de endotélio geralmente é menos pronunciado do que em artérias. No entanto, os diversos experimentos realizados por diferentes pesquisadores divergem na ênfase dada ao relaxamento, considerando as vias e os fatores envolvidos. Também é referido que o NO ou drogas doadoras de NO, são mais potentes em veias, a seguir, em grandes artérias e, menos, em pequenas arteríolas (Yang *et al.*, 1991).

Assim, atualmente é reconhecido que a camada de células endoteliais que reveste o sistema vascular, além de atuar como barreira passiva, impedindo a livre saída de células e proteínas para os tecidos, controla a contração e o relaxamento das células musculares lisas adjacentes (Woodman, 1995), havendo, ainda, além do NO e FHDE mencionados, outros fatores endoteliais vasoativos (Gryglewski, 1995a, b). O tromboxano  $A_2$ , por exemplo, media a resposta contrátil no tecido vascular (Furchgott e Vanhoutte, 1989; Sánchez-Ferrer e Marín, 1990) e a prostaciclina a resposta vasorrelaxante (Moncada *et al.*, 1976). Já as endotelinas, peptídeos vasoconstritores produzidos pelo endotélio, estão presentes no sistema cardiovascular, sendo a endotelina-1 a mais potente nos vasos humanos (Davenport e Maguire, 1994). É considerado ainda que para os diferentes subtipos



de receptores da endotelina (ET) existam efeitos opostos. Assim, os receptores ET<sub>A</sub> podem mediar a constrição do músculo liso e os ET<sub>B</sub> podem estar envolvidos na liberação de NO do endotélio (Sakurai *et al.*, 1992). Entretanto, em alguns vasos sanguíneos, os receptores para ET<sub>B</sub>, mas não os para ET<sub>A</sub>, são responsáveis pela vasoconstrição (Masaki *et al.*, 1994), podendo haver dois subtipos de receptores ET<sub>B</sub>, um mediando a constrição e o outro a liberação de substâncias vasodilatadoras do endotélio (Douglas *et al.*, 1994).

### 1.3. Vias do óxido nítrico e endotélio

Nos mamíferos, as óxido nítrico sintases (NOS) que sintetizam o NO (Förstermann, 1994; Natan e Xie, 1994) podem ocorrer na forma constitutiva: endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) e na forma indutiva (iNOS) (Quinn *et al.*, 1995). As NOS são flavoproteínas que apresentam homologia com o citocromo P<sub>450</sub> NADPH redutase. Nos seres humanos, o gene está localizado no cromossomo 7, 12 e 17 para eNOS, nNOS e iNOS, respectivamente (Knowles e Moncada, 1994).

As NOS, na isoforma constitutiva (presente sob condições fisiológicas), ocorrem no tecido vascular, especialmente no endotélio (Gryglewski, 1995a, b), no sistema nervoso central e em fibras nervosas não-adrenérgicas não-colinérgicas. As enzimas constitutivas são ativadas pelo complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina e produzem quantidades muito menores de NO do que a enzima indutiva (Aoki *et al.*, 1995;

Zhang e Snyder, 1995) . Além de ser controlada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a eNOS também sofre a influência do pH do meio, e é provavelmente regulada como uma resposta a alguns estímulos, tais como o estresse de cisalhamento do fluido sangüíneo e o estrogênio (Busse e Fleming, 1995).

A iNOS pode ser produzida em resposta a diversas citocinas e nesta forma é encontrada em uma variedade de células, entre elas, nos macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, músculo liso vascular, miócitos cardíacos, hepatócitos, células microgliais, como também nas ilhotas de Langerhans (Southern *et al.*, 1990; Kiechle e Malinski, 1993; Eizirik e Leijerstam, 1994; Kostka, 1995). Há evidências de que certos tipos de células, sob certas condições, possam expressar mais do que uma isoforma de NOS. Por exemplo, células endoteliais que apresentam a enzima constitutiva, quando estimuladas com citocinas e endotoxina bacteriana, passam a expressar também a enzima indutiva (Gibaldi, 1993; Fernandes e Assreuy, 1994; Schulz e Triggle, 1994).

Todas as três isoenzimas catalisam a oxidação de 5 elétrons da arginina para o óxido nítrico e L-citrulina, usando a fosfato-dinucleotídeo-adenina-nicotinamida reduzida (NADPH) como fonte de elétrons e os cofatores (6R)-5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) (para revisão ver Billiar, 1995; Kerwin et al., 1995; Mayer, 1995).

Todas as isoformas clonadas possuem consenso de sequência de fosforilação para a proteína quinase dependente do monofosfato de 3',5'- adenosina cíclico (AMPc) (PKA). Estudos bioquímicos demonstraram que a nNOS pode ser fosforilada pela PKA, proteína quinase C, proteína quinase dependente de GMPc ou proteína quinase dependente do complexo cálcio- calmodulina (Brüne e Lapetina, 1991; Nakane et al., 1991; Bredt et al., 1992). A fosforilação pode interagir de várias maneiras com a modulação da enzima. Assim, o NO pode estimular a guanilato ciclase para formar GMPc e inibir a NOS via proteína quinase dependente de GMPc (Zhang e Snyder, 1995). O complexo cálcio-calmodulina ativa diretamente a enzima, mas a fosforilação via proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina a inibe. Além disso, o cálcio ativa a proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, inibe a NOS através da fosforilação (Hecker *et al.*, 1993; Davada *et al.*, 1994).

O NO liberado ativa a guanilato ciclase solúvel nas células musculares lisas vasculares e plaquetas o que, por sua vez, aumenta os níveis do mensageiro intracelular GMPc (Ignarro *et al.* 1984; Burton *et al.* 1990; Radomski *et al.* 1990). O receptor endógeno para o NO é o grupo heme da guanilato ciclase (Mccall e Vallance, 1992) e o NO ligado à guanilato ciclase solúvel desloca o ferro heme produzindo uma alteração conformacional da enzima, a qual ativa o sítio catalítico (Ignarro *et al.*, 1982; Rubanyi, 1988; Schmidt, 1992).

Vários mecanismos foram propostos para explicar o relaxamento induzido pelo GMPc: inibição da produção de inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Rapoport, 1986; Rapoport e Murad, 1986; Lang e Lewis, 1989; Ormandy e Joep, 1989); estimulação do seqüestro de cálcio intracelular (Lincoln, 1983; Morgan e Newby, 1989; Garg e Hassid, 1991; Benzing *et al.*, 1992) através da ATPase dependente de Ca<sup>2+</sup> (Fiscus, 1988); aumento da desfosforilação da miosina quinase de cadeia leve (Rapoport *et al.*, 1983; Maggi *et al.*, 1995); inibição de canais de cálcio operados por receptor (Godfraind, 1986); ativação de proteínas quinases dependentes de GMPc (Rapoport *et al.*, 1983; Popescu *et al.*, 1985; Fiscus, 1988) e aumento da permeabilidade ao potássio, causando hiperpolarização da membrana (Komori e Suzuki, 1987). O GMPc pode ainda atuar regulando a atividade de algumas fosfodiesterases (Garthwaite, 1991), sendo proposto que ele possa aumentar o AMPc, através da inibição da fosfodiesterase III nas plaquetas e em preparações vasculares (Burns *et al.*, 1994; Eckly e Lugnier, 1994).

#### **1.4. Implicações fisiopatológicas da alteração da via do óxido nítrico no endotélio**

Inúmeros relatos têm demonstrado a importância da ação da L-arginina, via NO, em diversas patologias, sugerindo que vários estágios de doenças e desordens podem estar associados tanto a uma super quanto a uma subprodução de NO (Kerwin e Heller, 1994; Fukuto e Chaudhuri, 1995; Moncada e Higgs, 1995).

Uma vasodilatação reduzida e um tônus vasoconstritor excessivo propiciam um suprimento sangüíneo inadequado e o desenvolvimento de patologias vasculares crônicas (Calver *et al.*, 1993; Moncada, 1994; Tikkanen e Fyhrquist, 1995; Woodman, 1995). Desta forma, a função endotelial está prejudicada em várias doenças isquêmicas (Kaiser *et al.* 1989; Pieper *et al.* 1992), tais como a hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes, que podem apresentar a liberação do NO comprometida (Rees *et al.*, 1989a, b; Dohi *et al.*, 1990; Linder *et al.*, 1990; Panza *et al.*, 1990; Verbeuren *et al.*, 1990; Otsuji *et al.*, 1995; Harrison, 1995). O dano endotelial foi relacionado ao processo aterosclerótico (Förstermann, *et al.*, 1988) observado em pacientes (Chester *et al.* 1990; Vita *et al.* 1990; Lefroy *et al.* 1993; Quyyumi *et al.* 1995) e em animais tratados com dieta rica em gorduras e colesterol e assim tornados hiperlipidêmicos (Shimokawa e Vanhoutte, 1989; Cooke *et al.* 1991). Além disso, o NO pode ser imediatamente inativado pela hemoglobina, em consequência da afinidade pelo ferro do heme (Martin *et al.*, 1985; Ignarro, 1990) ou pela ação de radicais livres derivados de oxigênio (Bassenge, 1992).

No diabetes mellitus, a patogênese da doença vascular está relacionada à disfunção endotelial conseqüente da hiperglicemia, tendo sido observada uma diminuição no relaxamento vascular endotelial de animais diabéticos (Oyama *et al.*, 1986; Tesfamariam *et al.*, 1989; Kihara e Low, 1995) e em tecidos vasculares humanos (Saenz de Tejada *et al.*, 1988 e 1989). Também foi observada uma

produção aumentada de radicais livres derivados de oxigênio e uma diminuição nos eliminadores de radicais livres no diabetes (Wolff e Dean, 1987), sendo sugerido que os últimos possam ter um envolvimento com a ação vasoconstritora dos prostanóides. É considerado que as enzimas aldose redutase, proteína quinase C e  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a glicosilação de proteínas também estejam envolvidas nesse processo (Cohen, 1993).

As células endoteliais, entre outras, geram radicais livres como o NO, ânions superóxido, radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e derivados da peroxidação lipídica, tais como a prostaciclina e outros metabólitos da ciclooxigenase e a interação entre esses vários agentes contribuem para a regulação do tônus vascular (Gryglewski *et al.*, 1986; Vanhoutte, 1987; Lawson *et al.*, 1991; Katusic *et al.*, 1993; Gross e Wolin, 1995; Marín e Rodríguez-Martínez, 1995). Também é considerado que a disfunção observada em vasos sanguíneos ateroscleróticos possa resultar de uma degradação aumentada de NO como, por exemplo, pelos ânions de superóxido derivados do endotélio (Mugge *et al.*, 1991), ao invés de uma redução na taxa de síntese de NO. Foi demonstrado que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) diminuem o efeito estimulatório do NO nas plaquetas bovinas derivadas da guanilato ciclase solúvel (Schmidt *et al.*, 1990).

Ao contrário do que ocorre em tecidos saudáveis, no ateroma ou na hiperlipidemia o excesso de L-arginina reverte algumas anormalidades encontradas

(Girerd *et al.*, 1990), restaurando ainda a resposta dilatadora da circulação coronariana à ACh (Drexler *et al.*, 1991). A administração de L-arginina também aumenta a produção de NO, prevenindo a hipertensão causada pela ingestão de cloreto de sódio em ratos (Chen *et al.*, 1993).

O ânion superóxido pode produzir vasoconstrição, inativando o NO ou o vasorrelaxamento mediado pela formação de peroxinitrito que parece estimular a guanilato ciclase nas células do músculo liso, ou então pela produção de um fator relaxante estável mediado pelo superóxido que causa hiperpolarização pela abertura de canais de  $K^+$  sensíveis à ATP (Kim *et al.*, 1992). O peróxido de hidrogênio pode provocar vasorrelaxamento (Ku *et al.*, 1992) estimulando a liberação de NO ou ativar a guanilato ciclase solúvel em células do músculo liso ou, ainda, vasoconstrição que parece ser mediada pelo tromboxano  $A_2$  (para revisão, ver Marín e Rodríguez-Martínez, 1995).

Após serem liberados das células endoteliais, a prostaciclina ( $PGI_2$ ), o NO e um peptídeo, o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA), interagem (Gryglewski, 1995a), podendo haver um sinergismo entre os dois primeiros. As artérias ateroscleróticas apresentam-se prejudicadas quanto a sua capacidade de liberar  $PGI_2$ , NO e t-PA sendo que a deficiência de  $PGI_2$  endotelial induzida pela peroxidação lipídica ativa a aterosclerose (Szczeklik e Gryglewski, 1980; Lidbury *et al.*, 1990; Gryglewski, 1993).

A síntese ou a liberação de PGI<sub>2</sub> ou de NO (Ohgushi *et al.*, 1993), como também a atividade da iNOS em macrófagos (Yang *et al.*, 1994), parecem ser inibidas pela oxidação do LDL. Apesar dos mecanismos de ação não estarem totalmente elucidados, em algumas anormalidades como nas doenças degenerativas crônicas, a diminuição do NO ocorre devido a um prejuízo na ação de proteínas G, ativação de receptores e alterações nos níveis de cálcio intracelular e, posteriormente, pela diminuição da biodisponibilidade da L-arginina (Flavahan, 1992). No entanto, outros autores alegam que a oxidação do LDL inativa o NO após a sua liberação, ao invés de inibir sua produção (Galle *et al.*, 1991).

### **1.5. Constituintes fitoquímicos e proteção tissular**

Os flavonóides, compostos polifenólicos, podem ser encontrados em vegetais e frutas (Hermann, 1988; Hertog *et al.*, 1993). Esses compostos são antioxidantes potentes (Afanas'ev *et al.*, 1989; Ramanathan e Das, 1992), apresentando a propriedade de eliminar radicais livres (Robak e Gryglewski, 1988; van-Acker *et al.*, 1995), os quais parecem estar envolvidos nos danos celulares (Whalley *et al.*, 1990; Nègre-Salvagyre e Salvagyre, 1992). Em processos patológicos, como por exemplo no diabetes mellitus, os compostos flavonoídicos demonstraram proteger certas células, diminuindo a permeabilidade vascular e a fragilidade dos capilares na insuficiência venosa (Sorata, 1984; Bertuglia *et al.*, 1995). Por inibirem a



ciclooxigenase, os flavonóis (OH na posição C<sub>3</sub>) podem atuar diminuindo a agregação plaquetária, havendo, conseqüentemente, uma redução na tendência para a formação de trombos (Moroney *et al.*, 1988; Laughton *et al.*, 1991). A quercitrina, quercetina e a miricetina fazem parte do grupo dos flavonóis (Kühnau, 1976) e para as duas últimas, em especial, foram demonstradas diversas ações biológicas, particularmente no sistema vascular (Gryglewski *et al.*, 1986; Formica e Regelson, 1995). Husain *et al.* (1987) classificaram estas duas substâncias como as mais potentes quanto à capacidade de eliminar radicais livres, dentre os vários flavonóides estudados. A quercetina inibiu a oxidação e citotoxicidade do LDL *in vitro* (Nègre-Salvagyre e Salvagyre, 1992), que é considerado aterogênico e desempenha papel importante na formação de placas ateroscleróticas (Steinberg *et al.*, 1989).

Os taninos, constituintes polifenólicos, são divididos em duas classes principais, hidrolisáveis e condensados, sendo possível encontrar ambos numa mesma planta. Os taninos hidrolisáveis são poliésteres que podem ser cindidos hidroliticamente pela ação de ácidos ou de enzimas, dando origem a uma porção açúcar e a um ácido fenolcarboxílico. De acordo com a estrutura deste ácido, este grupo é subdividido em taninos gálicos e elágicos. Os taninos gálicos, por hidrólise, fornecem apenas o ácido gálico, podendo ocorrer a formação do ácido m-digálico, originário da reação de duas moléculas de ácido gálico. Os taninos elágicos, por

hidrólise, além da porção açúcar e do ácido gálico, fornecem derivados deste ácido. Os taninos condensados são caracterizados por não serem hidrolisáveis, apresentarem tendência a se polimerizar formando produtos insolúveis em numerosos solventes, não possuírem açúcares em sua molécula e serem estruturalmente aparentados aos flavonóides (para revisão, ver Haslam, 1989; Hagerman, 1992).

O algodão contém taninos e a sua presença é freqüentemente relacionada à bissinose, doença pulmonar causada pela inalação do pó da planta em algodoeiros. Nas células epiteliais das vias aéreas, entre outros efeitos, os taninos inibem a produção de AMPc (Cloutier e Guernsey, 1995a, b). Além disso, os taninos demonstraram também relaxar *in vitro*, anéis de artéria pulmonar (Russel e Rohrbach, 1989) e de aorta de rato (Fitzpatrick *et al.*, 1993), quando ambas as preparações eram previamente contraídas com noradrenalina. Os últimos autores, de acordo com os seus resultados, sugeriram que os taninos poderiam estar envolvidos nos aumentos dos níveis de GMPc, em aorta de rato com endotélio íntegro.

## 1.6. Proposta de trabalho

O diabetes mellitus é uma síndrome clínica que se caracteriza por distúrbios endócrino-metabólicos que alteram a homeostase, e que tem como característica fundamental uma deficiência insulínica absoluta ou relativa que, conseqüentemente, causa elevação da glicose no sangue, como alteração mais evidente e de maior repercussão clínica (Chacra, 1988). O diabetes mellitus insulino-dependente (DMID) ou do tipo I, que geralmente inicia na infância ou na juventude, caracteriza-se por uma deficiência insulínica absoluta e o diabetes mellitus não insulino-dependente (DMNID) ou do tipo II, característico da idade adulta, apresenta o pâncreas com uma certa capacidade de secretar insulina. (Arduíno, 1980; Pupo, 1988). É considerado que, de modo geral, 3 a 5% da população seja diabética e, do total de casos, 90% são DMNID e aproximadamente 10% são DMID (Brasil, 1993).

Entre as várias complicações decorrentes do diabetes, especialmente na ausência de um controle glicêmico e tratamento adequado, destacam-se as doenças vasculares e a hipertensão. O risco de doença coronariana é duas a três vezes maior em pessoas diabéticas do que em não diabéticas e, nos países industrializados, é responsável por 30 a 50% das mortes de diabéticos com mais de 40 anos de idade (Brasil, 1993).

No nosso meio, várias plantas são popularmente utilizadas com o propósito de reduzir a glicemia, por portadores do diabetes mellitus. No entanto, são raros os

trabalhos científicos que confirmam a eficácia de tais procedimentos, tanto a nível clínico quanto experimental (Oliveira e Saito; 1989; Rahman e Zaman, 1989; Russo *et al.*, 1990; Swanston-Flatt *et al.*, 1990; Roman-Ramos *et al.*, 1991; Pepato *et al.*; 1993).

Como proposta inicial de trabalho, foram realizados experimentos agudos com algumas plantas medicinais, sendo observado que o extrato bruto hidroetanólico das folhas de *E. uniflora* (EBHA de *E. uniflora*) foi o mais eficaz, dentre as plantas testadas, diminuindo a glicemia 6 e 8 horas após o tratamento com o extrato, na concentração de 1 g/kg, por via oral.

Com o objetivo de complementar esses experimentos *in vivo*, foram realizados estudos *in vitro*, em aorta torácica isolada de rato, a fim de verificar um possível efeito do extrato de *E. uniflora*, como bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP, mimetizando o efeito de uma classe de drogas hipoglicemiantes, as sulfoniluréias. Apesar desta ação não ter sido confirmada, foi observado um efeito relaxante dependente de endotélio, em aorta torácica de rato contraída previamente com noradrenalina.

Devido a inter-relação entre o sistema cardiovascular e várias doenças crônico-degenerativas, como o diabetes mellitus, e com base nos primeiros resultados obtidos, foi proposta a investigação de uma possível ação hipoglicemiante do EBHA de *E. uniflora*, através do estudo de doses repetidas, *in vivo*, bem como sua ação vasorrelaxante na aorta torácica isolada de ratos.

## 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1. Avaliar a atividade hipoglicemiante do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Eugenia uniflora* L. (EBHA de *E. uniflora*), em experimentos de doses repetidas, em ratos normais e diabéticos induzidos por estreptozotocina.
2. Caracterizar o efeito farmacológico do EBHA de *E. uniflora* em preparações isoladas do músculo liso como: íleo de cobaia, útero isolado de rata, ducto deferente de rato e anel de aorta torácica de rato.
3. Investigar os possíveis mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* na aorta torácica isolada de rato.
4. Averiguar uma possível interferência da via do óxido nítrico sobre o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora* na aorta torácica de rato com endotélio íntegro, na presença de inibidores da óxido nítrico sintase.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos machos (160-180 g para os experimentos *in vivo*; 250-350 g para os *in vitro*) e fêmeas (200-250 g), além de cobaias de ambos os sexos (350-450 g).

Os animais foram criados no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia, CCB, UFSC e, alojados em gaiolas plásticas, em média de um número de 6 a 10, mantidos em temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram fornecidas dieta comercial e água *ad libitum* até momentos antes das condições experimentais.

#### 3.2. Material botânico

As folhas de *E. uniflora* foram coletadas no bairro Sambaqui, em Florianópolis, nos meses de setembro e outubro de 1993, no período matutino.

A identificação botânica foi realizada pela Prof<sup>a</sup> Ana Zanin, do Departamento de Botânica, CCB, UFSC sendo uma exsicata depositada no Herbário FLOR do Horto Botânico desta Universidade, sob o número 25.760.

### 3.3. Obtenção do extrato bruto hidroetanólico

As folhas foram secas em estufa (FANEM) à temperatura de até 40°C, trituradas em moinho e maceradas em uma mistura hidroetanólica (v/v: 8 partes de etanol e 2 partes de água destilada), na proporção de 50 g de folhas secas e moídas para 1 L de solvente extrator, por um período de 10 dias à temperatura de 4°C. Posteriormente, o extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (ASTEN), sob pressão reduzida à temperatura máxima de 50°C, para eliminação do etanol, obtendo-se desta forma, o extrato bruto hidroetanólico das folhas de *E. uniflora* (EBHA de *E. uniflora*). A concentração do extrato foi determinada a partir de 4 alíquotas de 1 mL, as quais foram evaporadas em estufa a 40°C até exibirem peso constante. Os pesos dos resíduos secos foram determinados em balança analítica, obtendo-se uma concentração de 160 mg/mL.

### 3.4. Análise química

#### 3.4.1. Partição do EBHA

Uma alíquota do EBHA de *E. uniflora* foi levada à secura em banho-maria, obtendo-se 51 g do extrato seco. Este extrato foi suspenso em água destilada e submetido à partição com solventes de polaridade crescente: diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e acetato de etila ( $\text{AcOEt}$ ). As frações foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida e temperatura inferior a 60°C, obtendo-se 9 g da fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 4,8 g da fração  $\text{AcOEt}$  e 37 g da fração aquosa.

### 3.4.2. Estudo fitoquímico preliminar

Foi realizada a análise fitoquímica preliminar do EBHA de *E. uniflora* e de suas frações, de acordo com os métodos da Organização Mundial da Saúde para caracterizar a presença das principais classes dos constituintes químicos presentes, a saber, alcalóides, cumarinas, flavonóides, antraquinonas livres, saponinas, esteróides e/ou triterpenos e taninos (Dominguez, 1973; Akerele, 1984). Esta análise foi realizada no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC.

### 3.4.3. Análise química das frações AcOEt e aquosa

Para o fracionamento das frações AcOEt e aquosa, foram utilizados métodos cromatográficos, objetivando o isolamento e a purificação dos seus constituintes químicos. A identificação foi realizada empregando-se métodos cromatográficos em escala analítica e os métodos espectroscópicos ultravioleta (UV), infra-vermelho (IR), ressonância nuclear magnética (NMR) e espectrometria de massa (MS).

A partição do EBHA de *E. uniflora* e a análise química das frações foram realizadas pelo químico João Francisco Gomes Correia, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Marení Rocha Farias, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, UFSC.



### 3.5. Análise Farmacológica

#### 3.5.1. Avaliação da atividade hipoglicemiante

##### 3.5.1.1. *Indução do diabetes*

Os animais foram induzidos ao diabetes através da injeção de estreptozotocina (30 mg/kg), na veia dorsal do pênis, estando os ratos em jejum alimentar de 14-16 horas. A droga foi diluída em tampão citrato, pH 4,5, na concentração de 30 mg/mL. Os ratos normais foram submetidos ao mesmo procedimento, recebendo somente o tampão citrato. Posteriormente, os animais continuaram com livre acesso à água e recebendo a mesma dieta que anteriormente.

##### 3.5.1.2. *Administração do EBHA*

Três dias após as injeções (estreptozotocina ou veículo), os níveis glicêmicos e o peso corporal foram avaliados para realizar o pareamento dos animais, sendo os mesmos divididos em 4 grupos: diabéticos controle (DC) e tratados com o EBHA de *E. uniflora* (DT), normais controle (NC) e tratados com o EBHA de *E. uniflora* (NT). Cada animal foi colocado em uma gaiola metabólica individual, onde permaneceu até o final do experimento.

Os ratos tratados (tanto os diabéticos quanto os normais) receberam 2 vezes ao dia (8 e 17 horas), por gavagem, durante 18 dias, o EBHA de *E. uniflora*

(100 mg/kg). Os animais controle (DC e NC) foram submetidos ao mesmo procedimento, sendo, no entanto, o EBHA de *E. uniflora* substituído por água.

### 3.5.1.3. *Parâmetros bioquímicos e fisiológicos avaliados*

Durante o experimento, foram avaliados, três vezes por semana, o peso corporal (g); a glicosúria (g/volume urinário 24 h), pelo método de Summer (Hawk *et al.*, 1947); uréia urinária (mg/volume urina 24 h), pelo método de Crocker (Crocker, 1967) e, através de pequenas amostras de sangue da ponta da cauda de ratos conscientes, foi analisada a glicemia (mg/dL), através de um analisador de glicose (Beckman Instruments). A concentração de ácidos graxos ( $\mu\text{mol/mL/plasma}$ ) foi determinada no início e no final do experimento e a quantidade da gordura epididimal e retroperitoneal (g) foi medida somente no término do ensaio. As ingestões hídrica (mL/24 h) e alimentar (g/24 h) e o volume urinário (mL/24 h) foram mensurados diariamente.

### 3.5.2. Experimentos realizados com musculatura lisa não-vascular

#### 3.5.2.1. *Íleo isolado de cobaia*

Cobaias adultas, de ambos os sexos, foram sacrificadas por forte pancada na cabeça e secção dos vasos cervicais. Após a exposição do conteúdo abdominal, foi removida uma porção do íleo situado entre 10 e 30 cm da junção ileocecal, a qual foi transferida para uma placa de Petri, contendo solução de Tyrode a 37°C. A seguir,

a porção foi separada dos tecidos adjacentes, lavada internamente com o mesmo líquido e dividida em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento, montados em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Tyrode, aerada, mantida a 37°C, com a seguinte composição (mM): NaCl 137; KCl 2,68; NaHCO<sub>3</sub> 11,90; glicose 5,55; CaCl<sub>2</sub> 1,80; MgCl<sub>2</sub> 2,10; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42.

As contrações do íleo foram registradas por meio de uma alavanca isotônica de inscrição lateral, com ampliação de seis vezes e sob uma carga basal de 1,0 g, em papel esfumaçado adaptado ao cilindro de um quimógrafo Palmer. Após pelo menos 30 min de estabilização, com troca de solução nutriente a cada 10 min, foram feitas curvas concentração-efeito pelo método cumulativo (Van Rossum e Van Der Brink, 1963) à acetilcolina (10 nM-30 mM) e à histamina (100 nM-10 µM) na ausência ou na presença de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* (50-400 µg/mL) adicionadas à cuba 20 min antes.

#### 3.5.2.2. Útero isolado de rata

Ratas Wistar adultas virgens, injetadas 24 h antes com benzoato de estradiol (0,5 mg/kg, s.c.), foram sacrificadas com uma pancada na região occipital. Os fragmentos uterinos (1,5-2,0 cm) foram suspensos em cubas de vidro contendo 5 mL de solução nutritiva De Jalon, aerada, mantida à 30°C, com a seguinte composição (mM): NaCl 154,4; KCl 5,6; CaCl<sub>2</sub> 0,3; MgCl<sub>2</sub> 1,4; NaHCO<sub>3</sub> 1,7 e glicose 5,5.

As contrações foram registradas em quimógrafo, usando alavanca isotônica de inscrição lateral, sob carga basal de 1,0 g e ampliação de seis vezes. Decorrido o período de estabilização (30 min), durante o qual a solução nutritiva foi renovada a intervalos de 10 min, foram construídas curvas concentração-resposta à acetilcolina (0,01-30 mM) e à ocitocina (0,01 a 30 UI), pelo método cumulativo, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* (100-400 µg/mL) adicionadas à cuba 20 min antes.

Em outros ensaios, uma curva concentração-resposta cumulativa ao EBHA de *E. uniflora* foi feita com fragmentos uterinos contraídos previamente com ocitocina (30 mUI/mL).

#### 3.5.2.3. *Ducto deferente isolado de rato*

Ratos machos Wistar adultos foram sacrificados com uma pancada na região occipital sendo, a seguir, abertas as cavidades abdominais e os ductos deferentes transferidos para uma placa de Petri, contendo solução de LNV (Líquido Nutritivo para Vesícula) aquecida, para a remoção de tecidos adjacentes. Cada ducto deferente, desprovido do nervo hipogástrico, foi transferido para uma cuba de vidro contendo 5 mL de solução de LNV aerada e mantida a 30°C, com a seguinte composição (mM): NaCl 137,0; KCl 5,6; CaCl<sub>2</sub> 1,8; NaHCO<sub>3</sub> 15,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,36 e glicose 5,55.

As contrações foram registradas em quimógrafo, usando alavanca isotônica de inscrição lateral, sob carga basal de 1,0 g e ampliação de seis vezes. Decorrido o período de repouso (40 minutos), com troca de solução nutritiva a cada 10 min, foram construídas curvas concentração-resposta à noradrenalina (0,1-10 mM), pelo método cumulativo, na ausência ou na presença de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* (100-800 µg/mL), adicionadas à cuba 20 min antes.

### 3.5.3. Experimentos realizados com musculatura lisa vascular

#### 3.5.3.1. *Anel de aorta torácica isolada de rato*

Os ratos foram sacrificados com uma pancada na cabeça e deslocamento cervical. Aberta a cavidade torácica, a aorta foi transferida para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit a 37°C; removidos os tecidos adjacentes, a mesma foi dividida em anéis de cerca de 3-4 mm de comprimento.

A maioria dos experimentos foram conduzidos com preparações em que se manteve a integridade do endotélio, sendo que para a sua lesão deliberada foi introduzida uma haste de platina na luz do anel (Corrêa *et al.*, 1991). As preparações foram transferidas para cubas de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit normal com a seguinte composição (mM): NaCl 113; KCl 4,7; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgSO<sub>4</sub> 1,1; EDTA 0,025; ácido ascórbico 0,01 e glicose 11 ou Krebs-Henseleit despolarizante, mediante a substituição isosmótica de NaCl por KCl: despolarizante KCl 40mM

(NaCl 74 mM); 60 mM (NaCl 60 mM); 80 mM (NaCl 37 mM). A solução nutriente foi mantida à 37°C, pH 7,4 e aerada com uma mistura de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. As preparações foram suspensas entre duas hastes metálicas, uma das quais conectada a um transdutor de tensão isométrica, registrada através de miógrafo (F-60 myograph microdisplacement transducer, Narco Biosystems, USA) acoplado a um polígrafo de mesa (DMP-4B, Narco Biosystems, USA). Os anéis da artéria foram ajustados para uma tensão de repouso de 1,0 g e mantidos em equilíbrio por aproximadamente 1 h, com substituição da solução nutriente a cada 15 min.

Após o período de estabilização, a aorta foi contraída previamente com noradrenalina (NA 30-100 nM) e exposta à acetilcolina (ACh 1 µM). A integridade da camada do endotélio foi confirmada quando houve uma resposta relaxante à ACh superior a 80%, enquanto que o sucesso da remoção intencional dessas células foi considerado quando a ACh falhou em promover o relaxamento. Após a troca de solução nutriente e uma vez retornada a tensão à linha de base, os anéis foram novamente contraídos com NA (30-100 nM) ou KCl (40, 60, 80 mM) e foi obtida uma curva concentração-resposta cumulativa com o EBHA de *E. uniflora* (1-300 µg/mL) ou às frações: aquosa, acetato de etila e diclorometano (0,3-300 µg/mL).

Para corrigir possíveis alterações na sensibilidade das preparações, foram feitos experimentos paralelos com preparações para controle, obtidas do mesmo animal. Apenas uma curva cumulativa concentração-resposta do EBHA de

*E. uniflora* foi obtida na ausência ou na presença das diferentes drogas analisadas. Foram conduzidos, ainda, experimentos controles, apenas contraídos com NA.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de uma possível taquifilaxia aos efeitos do EBHA de *E. uniflora*, foi feita uma segunda curva ao extrato iniciando 30 min, 2 ou 4 h após o término da primeira curva, tendo sido a preparação lavada a cada 15 min. O relaxamento induzido pela ACh (1  $\mu$ M) e pelo nitroprussiato de sódio (NPS 1  $\mu$ M), em anéis de aorta torácica previamente contraídos com NA, foi avaliado após a segunda curva cumulativa do EBHA de *E. uniflora*. A ACh foi testada após 0,5, 2 e 4 horas e o NPS somente após 30 min.

Para investigar a participação da via do óxido nítrico (NO) na mediação do efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora* na aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, curvas concentração-resposta a esse extrato foram feitas na ausência ou na presença de um dos seguintes inibidores da óxido nítrico sintase: N<sup>w</sup> nitro L-arginina (30  $\mu$ M, L-NOARG), N<sup>w</sup> nitro metil éster L-arginina (30  $\mu$ M, L-NAME) e N<sup>G</sup> monometil-L-arginina (300  $\mu$ M, L-NMMA). Como controle positivo para a eficácia desses inibidores em bloquear a produção de NO, testou-se a sua influência sobre o relaxamento induzido pela ACh.

Em outros experimentos, o efeito do relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* foi analisado na presença de um excesso do substrato endógeno do NO, a L-arginina (1 e 10 mM) e de seu enantiômero inativo, a D-arginina (1mM), incubados previamente, 10 min antes da L-NOARG ou da L-NAME, ao banho.

Os inibidores da óxido nítrico sintase foram incubados 30 min antes de testar os efeitos do EBHA de *E. uniflora* ou da ACh.

O efeito do azul de metileno (10 e 30  $\mu\text{M}$ ), um agente que inibe a guanilato ciclase solúvel, também foi analisado, sendo incubado também 30 min antes da curva relaxante do extrato. Para verificar o efeito de outras classes de drogas na aorta torácica isolada de rato, foram testadas as seguintes substâncias: indometacina (1 e 10  $\mu\text{M}$ ) para avaliar a contribuição relativa dos produtos da ciclooxigenase; atropina (1  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador muscarínico; propranolol (1  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de adrenoceptores  $\beta$ ; pirilamina (1  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador histaminérgico; tetraetilamônio (TEA, 30  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador não seletivo de canais de potássio; apamina (0,3  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de canais de potássio dependentes de cálcio e glibenclamida (3  $\mu\text{M}$ ), um bloqueador de canais de potássio dependentes de ATP. O relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* foi analisado na presença dessas drogas incubadas por 20 minutos.

Para observar o efeito do EBHA de *E. uniflora* sobre a resposta contrátil à noradrenalina, foram feitas curvas cumulativas concentração-resposta a este agonista (10-300 nM), na ausência e na presença de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* (30-300  $\mu\text{g/mL}$ ) adicionadas à cuba 20 min antes.



### 3.6. Apresentação dos resultados e análise estatística

As respostas contráteis ou de relaxamento induzidas por agonistas foram apresentadas como porcentagens da resposta ao estímulo padrão (relaxante ou contrátil, considerada como 100%). A concentração inibitória 50% do relaxamento máximo ( $CI_{50}$ ), a concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ , ou seja, as concentrações de agonistas necessárias para causar a metade do efeito máximo do próprio agonista), o efeito da concentração máxima e o relaxamento máximo ( $R_{max}$ ) foram calculados a partir de curvas concentração-resposta individuais. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), exceto para as  $CI_{50}$  e  $CE_{50}$ , apresentadas como as médias geométricas acompanhadas por seus respectivos limites de confiança para 95% (Fleming *et al.* 1972).

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste *t* bicaudal de Student para amostras não-pareadas (Snedecor e Cochran, 1967) ou o teste de Newman-Keuls para mais de 2 amostras. Foram consideradas estatisticamente significantes, as diferenças ponto-a-ponto entre os valores experimentais obtidos em grupos distintos, com níveis de probabilidade iguais ou menores do que 5% ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.7. Drogas e reagentes

Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada e sais de pureza analítica.

Foram utilizadas as seguintes drogas: cloridrato de acetilcolina, cloridrato de L-arterenol (noradrenalina), indometacina, cloreto de nitroprussiato de sódio, cloreto de azul de metileno, N<sup>w</sup> nitro-L-arginina (L-NOARG), N<sup>w</sup> nitro metil éster L-arginina (L-NAME), acetato de N<sup>G</sup> monometil-L-arginina (L-NMMA), L-arginina, D-arginina, sulfato de atropina, acetato de tetraetilamônio, apamina, cloridrato de propranolol, maleato de pirilamina, glibenclamida, estreptozotocina, histamina (todas da Sigma Chemical Company, St. Louis, E.U.A.) e ocitocina (Syntocinon, da Sandoz, São Paulo, Brasil). O ácido cítrico foi procedente da Reagen e o citrato trissódico-2-hidrato da Merck.

A maioria das drogas foi estocada em alíquotas a 1-100 mM, mantidas a -20°C e diluídas diariamente antes dos experimentos. L-NOARG, L-NMMA, L-NAME e azul de metileno foram dissolvidos em salina tamponada com fosfato (PBS, concentração em mM: NaCl 137, KCl 2,7 e tampão fosfato 10). A noradrenalina foi dissolvida em HCl 0,01 N e diluída em 0,9% de NaCl contendo ácido ascórbico a 50 µg/mL. A indometacina foi diluída em etanol P.A.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1. Estudo fitoquímico do EBHA de *E. uniflora*, das suas frações e isolamento de seus constituintes químicos

Os resultados dos testes fitoquímicos preliminares do EBHA de *E. uniflora*, bem como das frações CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (diclorometano), AcOEt (acetato de etila) e aquosa estão resumidos na Tabela I. Foram encontradas reações positivas para compostos polifenólicos, flavonóides, taninos e esteróides e/ou triterpenos. Não foi detectada a presença de alcalóides, saponinas, leucoantocianidinas, cardenolídeos e antraquinonas livres.

O esquema I resume as diversas etapas dos procedimentos químicos realizados. O estudo químico da fração AcOEt permitiu a caracterização de seus constituintes principais: S-I, S-II/S-III e S-IV. A substância S-I foi caracterizada por cromatografia em camada delgada (CCD) com padrões e espectroscopia no ultravioleta (UV) como miricetina. As substâncias S-II/S-III foram caracterizadas em mistura, através de CCD com padrões, como sendo ácido gálico e quercitrina. A substância S-IV foi hidrolisada, sendo possível a caracterização, por CCD com padrões, de miricetina e rhamnose no produto da hidrólise. Outros estudos químicos ainda estão sendo realizados com o objetivo de elucidar a sua estrutura.

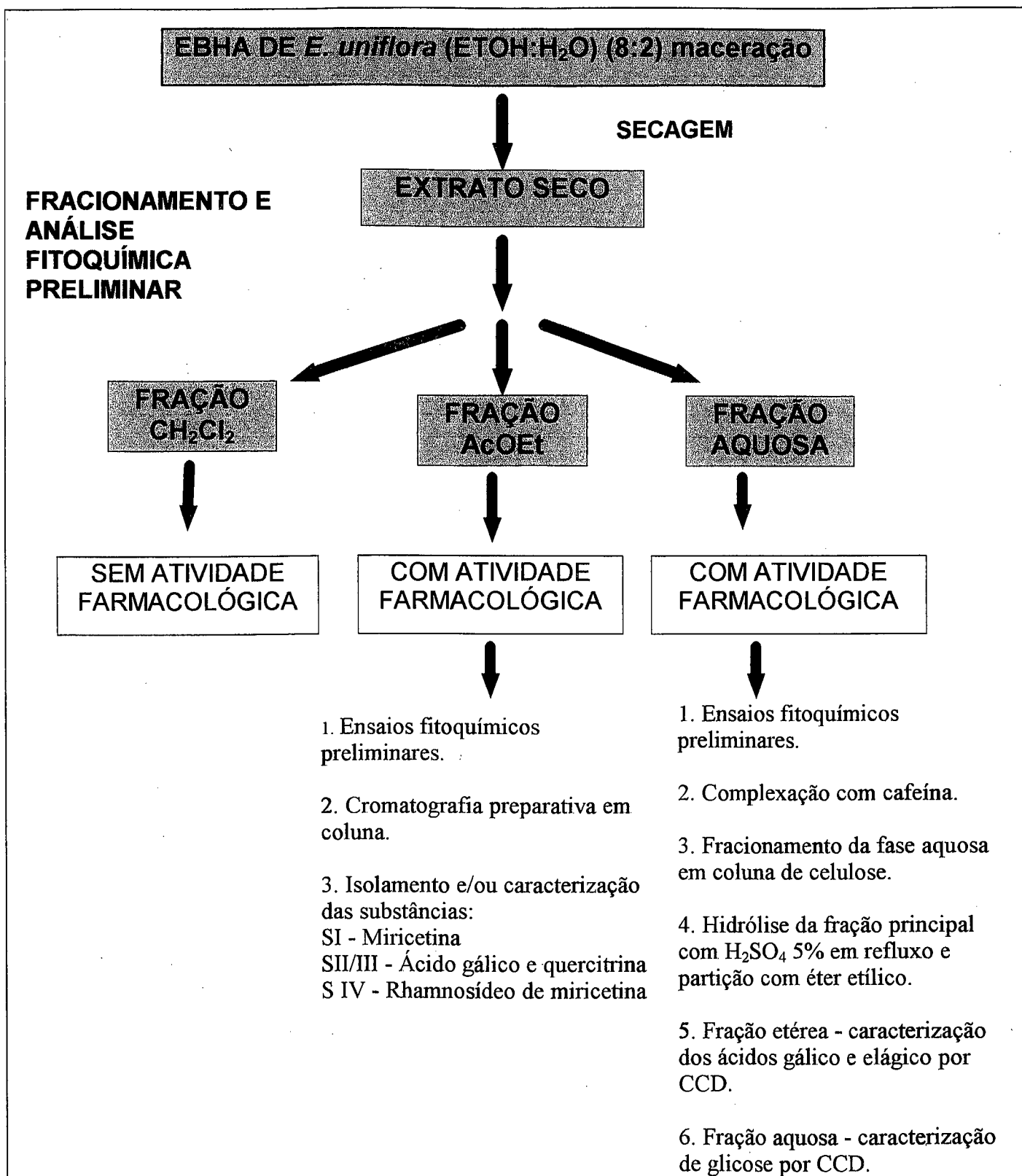
Após a hidrólise da fração principal, foi possível a caracterização de ácido gálico, de ácido elágico e de glicose, indicando a presença de taninos hidrolisáveis.

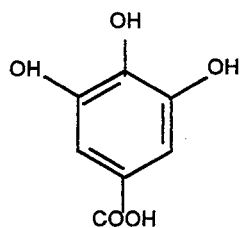
**Tabela I** - Abordagem fitoquímica preliminar do EBHA e frações de *E. uniflora*

GRUPO QUÍMICO	TESTE	RESULTADOS			
		EBHA	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	AQUOSA
Alcalóides	Reat. Dragendorff	-	-	-	-
	Reat. Valser-Mayer	-	-	-	-
	Reat. Wagner	-	-	-	-
	Reat. Bertrand	-	-	-	-
Saponinas	Teste de espuma	-	-	-	-
Esteróides/ Triterpenos	Reat. Liebermann-Burchard	+	+	-	-
Núcleo Esteroidal	Reat. Salkowski	+	+	-	-
Compostos Polifenólicos	Reação com FeCl <sub>3</sub> /K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	+	-	+	+
Flavonóides	Reação da cianidina ou de Shinoda	+	-	+	-
Taninos	Precipitação de proteínas	+	-	-	+
Leucoantocianidinas	Isenberg e Buchman (Teste de Gibbs)	-	-	-	-
Cardenolídeos	Reação de Baljet Reativo de Kedde	-	-	-	-
Antraquinonas Livres	Reação de Borntraeger	-	-	-	-

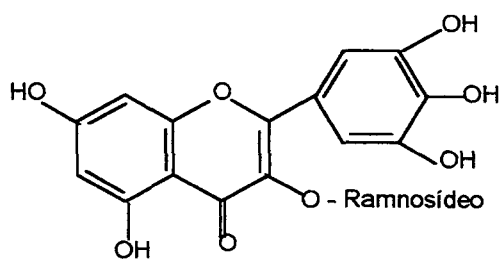
(-) negativo

(+) positivo

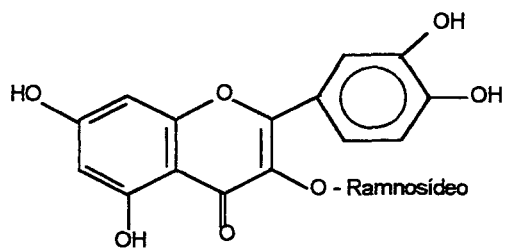
**Esquema I - Biofracionamento**



Ácido gálico



[Ramnosídeo da miricetina]



Quercitrina = ramnosídeo da quercetina

## Esquema II - Estruturas químicas

## 4.2. Análise farmacológica

### 4.2.1. Atividade hipoglicemiante do EBHA de *E. uniflora*

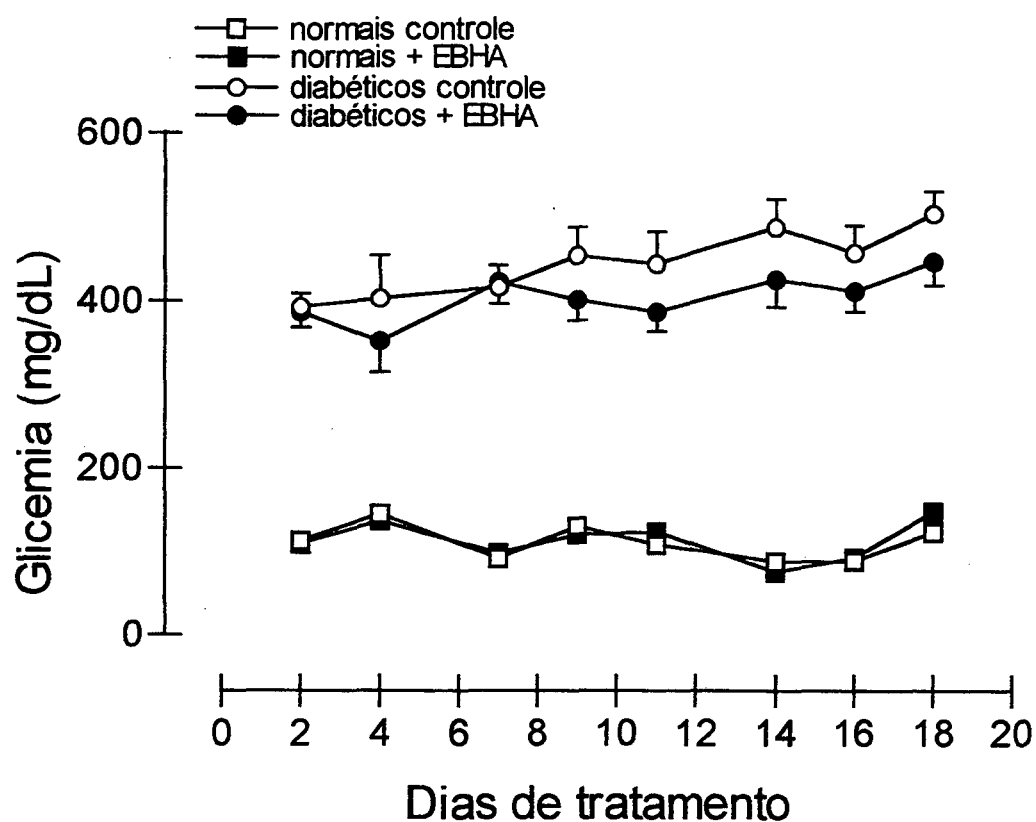
A Figura 2 e a Tabela II mostram um dos parâmetros bioquímicos avaliados, a glicemia (mg/dL), que não foi estatisticamente significativa, apesar da tendência dos animais diabéticos tratados com o EBHA de *E. uniflora* em apresentarem valores inferiores aos diabéticos controles. De acordo com os parâmetros analisados, o EBHA de *E. uniflora* não pode ser considerado antidiabetogênico quando ministrado em doses repetidas.

Foi encontrado um efeito inesperado em relação à curva de ganho de peso corporal (Figura 3 e Tabela III) dos animais tratados com o EBHA de *E. uniflora*, quando comparados aos controles. Apesar da proximidade numérica quanto ao peso dos ratos dos diferentes grupos, no início do experimento, os animais diabéticos tratados com o EBHA de *E. uniflora* apresentaram o menor ganho de peso nos 18 dias de tratamento (+ 15,50 g) e os normais controles o maior ganho (+ 91,2 g). Os animais normais tratados e os diabéticos controles chegaram ao final do experimento com aproximadamente o mesmo peso (+ 40,00 e + 39,20 g, respectivamente). O menor ganho de peso dos diabéticos tratados foi estatisticamente significativo em relação aos seus controles, a partir do 6º dia; quanto aos ratos normais tratados com o EBHA de *E. uniflora* em relação aos seus controles, a significância estatística manifestou-se a partir do 4º dia.

Quanto à avaliação da reserva adiposa epididimal (g), no final do experimento, houve significância estatística entre o grupo normal tratado ( $P \leq 0,05$ ) e o normal controle (dados não demonstrados). A quantidade de tecido gorduroso no controle foi superior ao tratado com o EBHA de *E. uniflora*, fato este justificado, considerando o epidídimo como reserva lipídica considerável em ratos, assim como a diferença no ganho de peso entre o grupo normal controle e o normal tratado, nos dias de experimento.

Não foram detectadas alterações estatisticamente significativas entre os grupos normais e diabéticos tratados com o EBHA de *E. uniflora*, em relação aos seus respectivos controles, nos demais parâmetros analisados: glicosúria; uréia urinária; ácidos graxos; peso da gordura retroperitoneal; ingesta hídrica; volume urinário e ingesta alimentar (resultados não apresentados).





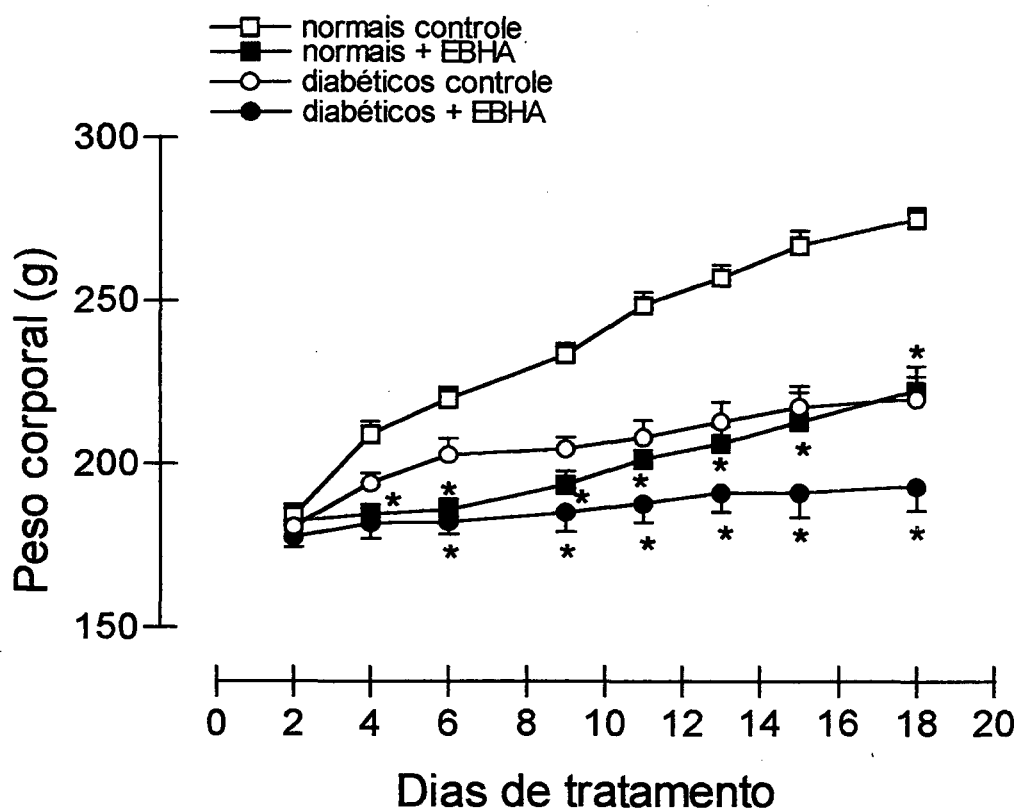
**Figura 2** - Efeito da administração diária do EBHA de *E. uniflora* (100 mg/kg, 2 vezes ao dia) sobre a **glicemia** de **ratos** normais ou diabéticos (estreptozotocina, 30 mg/kg). Cada valor representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 9 animais.

**Tabela II** - Efeito da administração diária do EBHA de *E. uniflora* (100 mg/kg, 2 vezes ao dia) sobre a glicemia (mg/dL) de ratos normais ou diabéticos (estreptozotocina, 30 mg/kg).

GRUPOS	N	DIAS DE TRATAMENTO							
		2º	4º	7º	9º	11º	14º	16º	18º
normais controle	5	113,0±7,9	145,2±6,1	92,2±1,3	131,0±4,6	108,0±7,2	88,0±9,8	89,0±4,7	123,4±10,5
normais tratados	5	110,0±11,2	137,0±4,5	98,0±6,6	121,0±8,4	123,8±6,9	75,7±5,3	93,0±1,8	148,2±8,9
diabéticos controle	9	392,0±15,9	402,0±51,2	416,0±25,8	454,0±33,8	443,0±38,3	487,0±33,8	457,0±33,3	505,0±26,6
diabéticos tratados	9	386,0±18,5	351,0±37,2	422,0±26,2	401,0±23,9	386,0±22,8	425,2±33,0	411,8±24,4	447,0±27,8

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

N = número de animais do respectivo grupo.



**Figura 3** - Efeito da administração diária do EBHA de *E. uniflora* (100 mg/kg, 2 vezes por dia) sobre o **peso corporal** de **ratos** normais ou diabéticos (estreptozotocina, 30 mg/kg). Cada valor representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 9 animais. Os asteriscos indicam diferença significativa \*  $P \leq 0,05$  quando comparados ao valor correspondente do grupo controle (teste “t” de Student).

**Tabela III** - Efeito da administração diária do EBHA de *E. uniflora* (100 mg/kg, 2 vezes ao dia) sobre o peso corporal (g) de ratos normais ou diabéticos (estreptozotocina, 30 mg/kg).

GRUPOS	N	DIAS DE TRATAMENTO							
		2º	4º	6º	9º	11º	13º	15º	18º
normais controle	5	184,0±3,4	208,9±4,1	220,0±3,6	233,2±3,6	248,4±3,9	257,1±4,0	267,0±4,5	275,2±3,6
normais tratados	5	182,5±3,3	184,6±2,9*	186,0±3,2*	193,6±4,1*	201,3±2,8*	206,3±5,2*	213,0±8,9*	222,5±7,5*
diabéticos controle	9	180,7±1,9	194,1±3,1	202,8±5,0	204,5±3,6	207,9±5,3	212,9±6,0	217,5±6,5	219,9±7,0
diabéticos tratados	9	177,6±3,0	181,9±4,8	182,3±3,8*	185,0±5,9*	187,8±5,8*	191,1±5,8*	191,2±7,6*	193,1±7,3*

Valores expressos como média ± erro padrão da média.

N = número de animais do respectivo grupo.

\* Significante em relação ao respectivo controle daquele dia ( $P \leq 0,05$ , teste “t” de Student).

#### 4.2.2. Atividade inibitória do EBHA de *E. uniflora* em preparações de musculatura lisa isolada

A incubação prévia, por 20 min, do EBHA de *E. uniflora*, alterou significativamente a sensibilidade do íleo isolado de cobaia à acetilcolina de 0,07 (0,03-0,15)  $\mu$ M para 11 (0,66-1,83)  $\mu$ M e 229 (104-505)  $\mu$ M, respectivamente, nas concentrações de 100 e 200  $\mu$ g/mL do EBHA de *E. uniflora*. Na concentração de 200  $\mu$ g/mL, o EBHA de *E. uniflora* aumentou o valor da  $CE_{50}$  da histamina, no íleo isolado de cobaia, de 0,49 (0,27-0,88) nM para 1,96 (1,28-3,01) nM, (Figura 4 e Tabela IV).

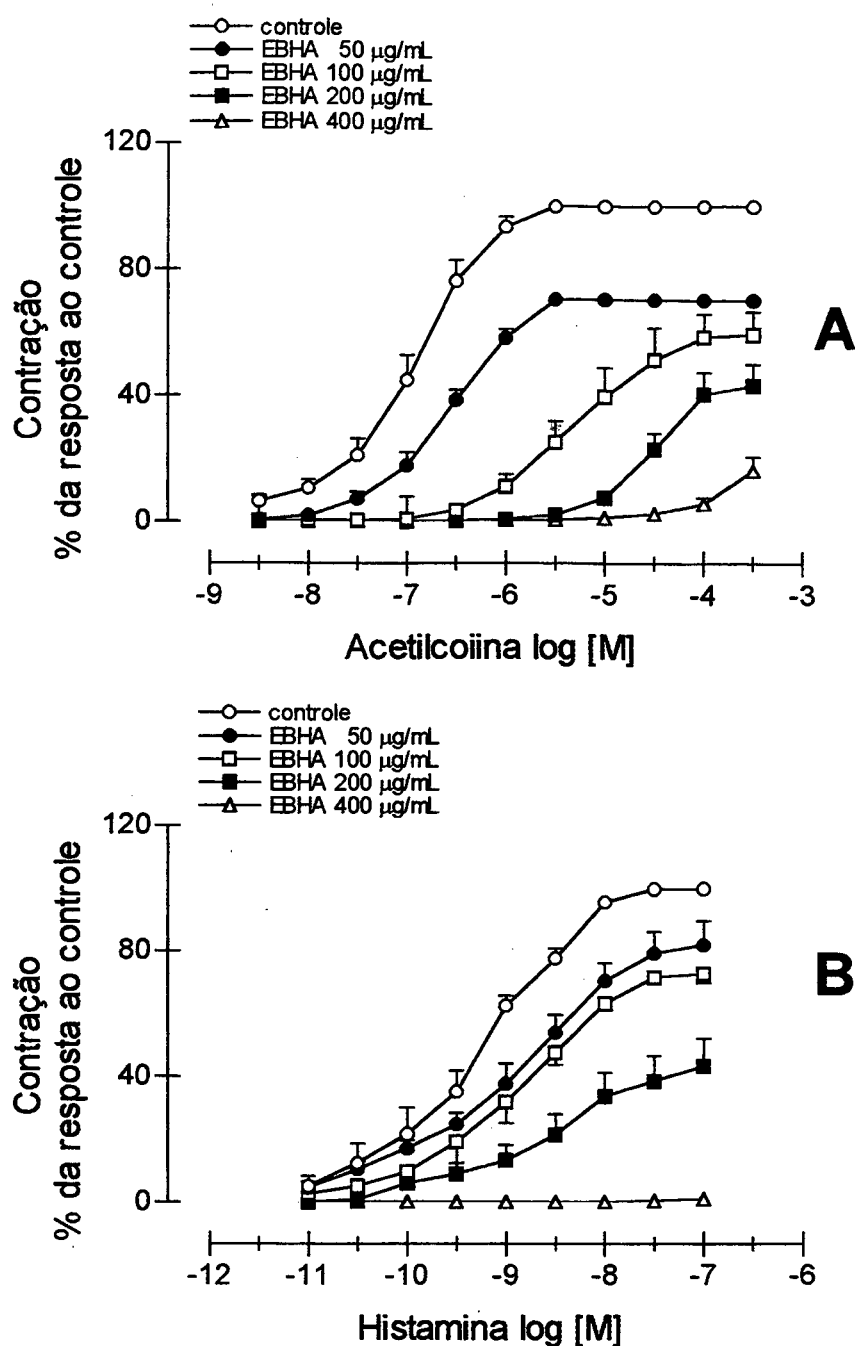
No útero isolado de rata, a incubação prévia de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* (100-400  $\mu$ g/mL) não modificou a sensibilidade deste órgão à acetilcolina e à ocitocina, alterando, entretanto, o efeito máximo (Figura 5 e Tabela V).

Em anel de aorta torácica e em ducto deferente de rato não houve alterações das  $CE_{50}$  da noradrenalina pela adição de concentrações crescentes, do EBHA de *E. uniflora* (100-800  $\mu$ g/mL) ao banho (Figura 6 e Tabela VI).

O EBHA de *E. uniflora* produziu uma inibição concentração-dependente da resposta contrátil máxima das preparações de musculaturas lisas aos vários agonistas estudados (Tabelas IV, V e VI). Assim, este extrato apresentou características de antagonismo não competitivo, alterando ou não a sensibilidade aos agonistas

analisados. Na Tabela VII estão representados os valores da  $CI_{50}$  deste extrato bruto em todas as preparações biológicas estudadas.

O EBHA de *E. uniflora* foi mais potente em inibir a resposta máxima contrátil da aorta torácica de rato à noradrenalina, dentre todos os agonistas estudados, com um valor de  $CI_{50}$  de 58 (53-63)  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela VII).



**Figura 4** - Curvas concentração-efeito médias obtidas pelo método cumulativo à acetilcolina (A) e à histamina (B), na ausência ou presença de concentrações crescentes (50-400 µg/mL) do EBHA de *E. uniflora* no íleo isolado de cobaia. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM de 4 a 6 experimentos.

**Tabela IV - Efeito do EBHA de *E. uniflora* (50-400 µg/mL) sobre as respostas contráteis à acetilcolina e à histamina no íleo isolado de cobaia**

<b>GRUPOS (µg/mL)</b>	<b>ACETILCOLINA</b>		<b>HISTAMINA</b>	
	$CE_{50} (\mu M)^{(1)}$	Efeito (%) <sup>(2)</sup>	$CE_{50} (nM)^{(1)}$	Efeito (%) <sup>(2)</sup>
Controle	0,07 (0,03 - 0,15) <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0,49 (0,27 - 0,88) <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
50	0,19 (0,10 - 0,33) <sup>a</sup>	70,46± 0,65 <sup>b</sup>	0,77 (0,34 - 1,77) <sup>a</sup>	82,01 ± 6,6 <sup>b</sup>
100	11,00 (0,66 - 183) <sup>b</sup>	59,83± 7,12 <sup>c</sup>	0,89 (0,32 - 2,50) <sup>a</sup>	72,74± 2,54 <sup>b</sup>
200	229 (104 - 505) <sup>c</sup>	43,60± 6,72 <sup>d</sup>	1,96 (1,28 - 3,01) <sup>b</sup>	43,26± 7,75 <sup>c</sup>
400	ND	16,48± 4,50 <sup>e</sup>	ND	1,16 ± 0,83 <sup>d</sup>

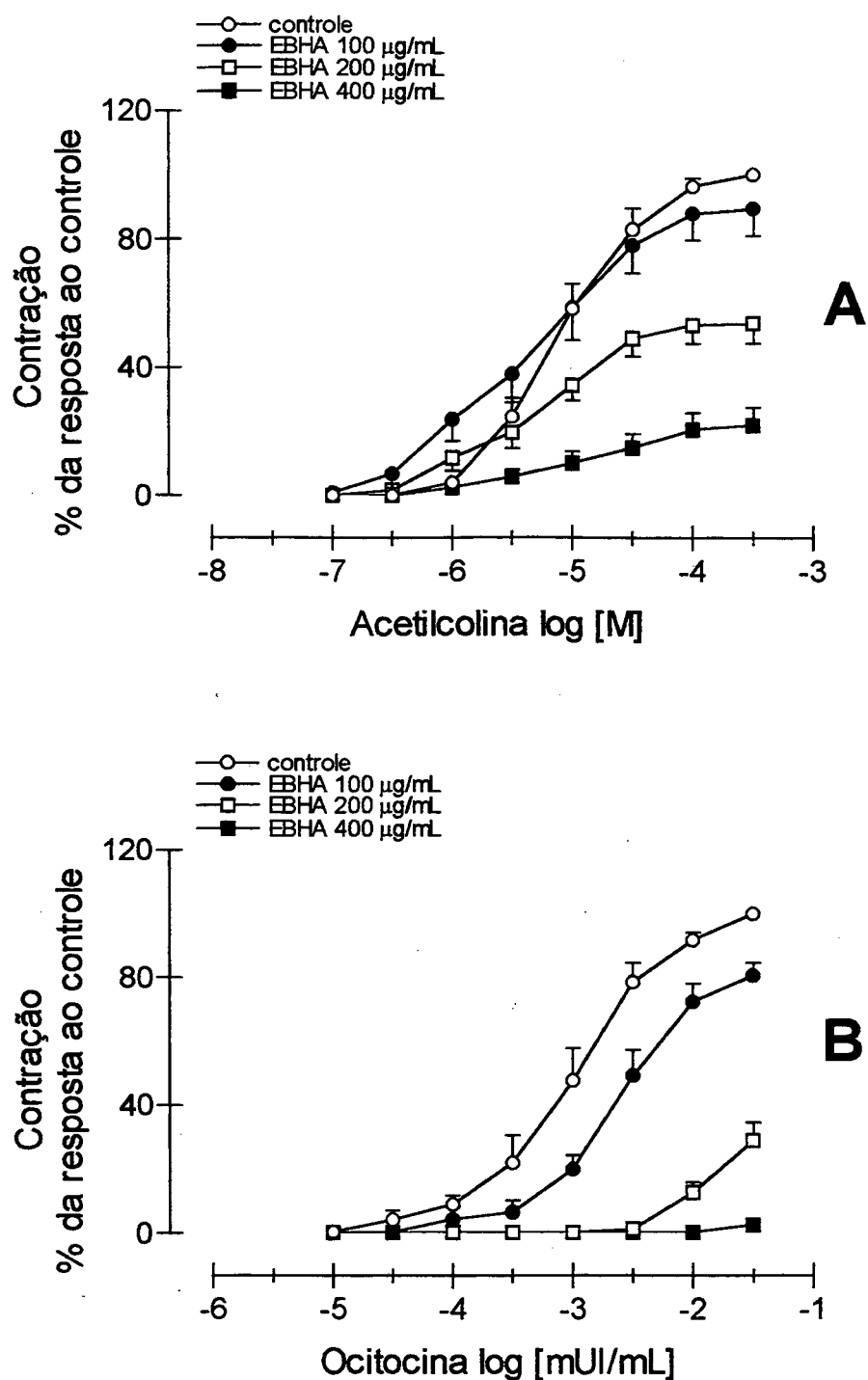
<sup>(1)</sup> Média geométrica das concentrações molares do agonista que produz 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com seus respectivos intervalos de confiança para 95% de probabilidade.

<sup>(2)</sup> Efeito da concentração máxima expresso como % do respectivo controle. Valores expressos como média ± EPM de 4 a 6 experimentos.

ND = não determinado.

Em cada grupo experimental, as diferentes letras indicam que os valores diferem significativamente entre si ao nível de 0,05 pelo teste de Newman Keuls.





**Figura 5** - Curvas concentração-efeito médias obtidas pelo método cumulativo à acetilcolina (A) e à ocitocina (B), na ausência ou presença de concentrações crescentes (100-400 µg/mL) do EBHA de *E. uniflora* no útero isolado de rata. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM de 6 a 7 experimentos.

**Tabela V** - Efeito do EBHA de *E. uniflora* (100-400 µg/mL) sobre as respostas contráteis à acetilcolina e à ocitocina no útero isolado de rata

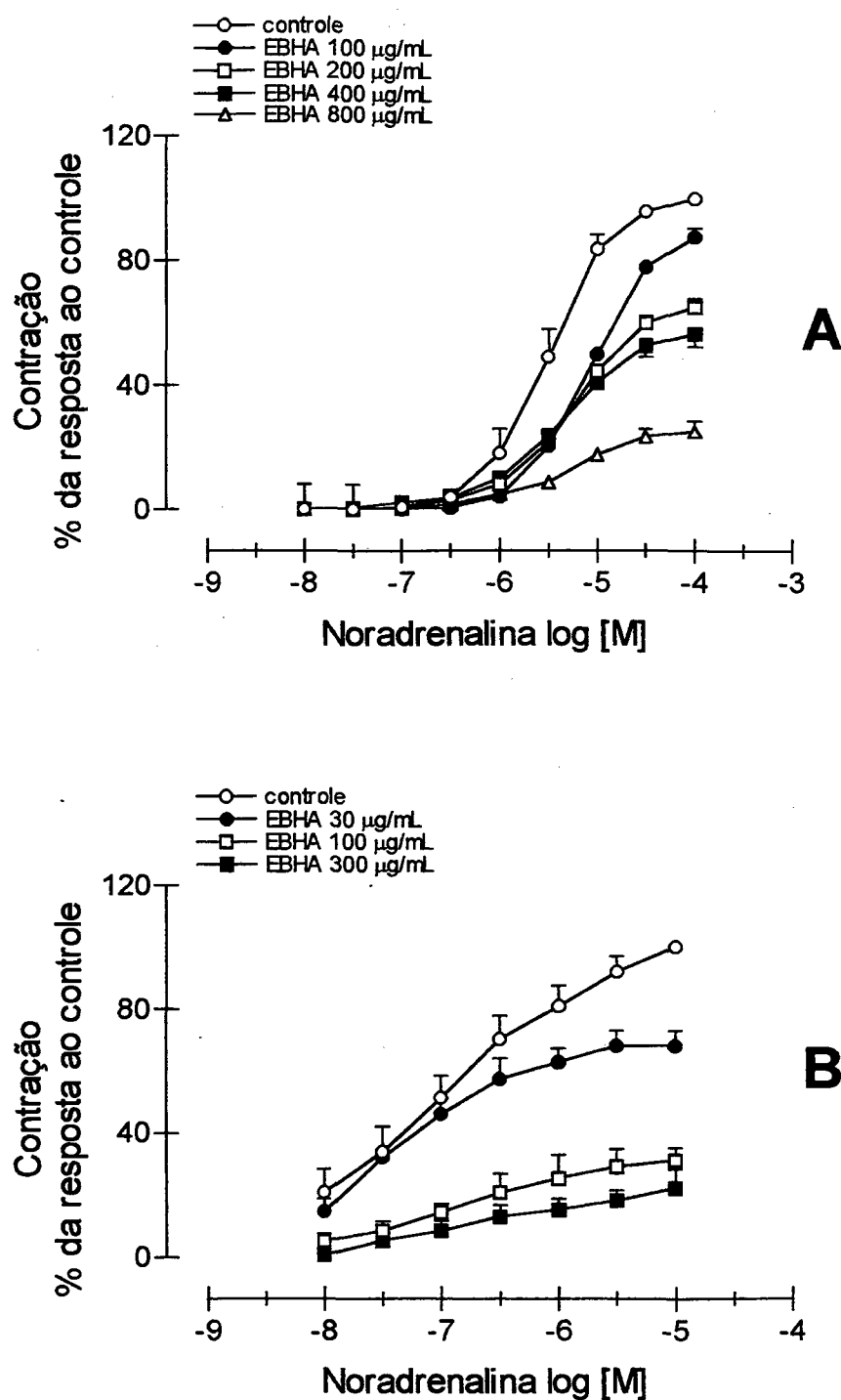
<b>GRUPOS (µg/mL)</b>	<b>ACETILCOLINA</b>		<b>OCITOCINA</b>	
	CE <sub>50</sub> (µM) <sup>(1)</sup>	Efeito (%) <sup>(2)</sup>	CE <sub>50</sub> (mUI/mL) <sup>(1)</sup>	Efeito (%) <sup>(2)</sup>
Controle	6,75 (4,04 - 11,29) <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	0,82 (0,41 - 1,64) <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
100	3,92 (2,02 - 7,58) <sup>a</sup>	89,49± 7,85 <sup>a</sup>	1,56 (0,77 - 3,18) <sup>a</sup>	80,57± 3,98 <sup>b</sup>
200	3,79 (2,04 - 7,02) <sup>a</sup>	54,01± 5,75 <sup>b</sup>	ND	28,97± 5,60 <sup>c</sup>
400	ND	22,20± 5,15 <sup>c</sup>	ND	2,53 ± 1,24 <sup>d</sup>

<sup>(1)</sup> Média geométrica das concentrações molares do agonista que produz 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com seus respectivos intervalos de confiança para 95% de probabilidade.

<sup>(2)</sup> Efeito da concentração máxima expresso como % do respectivo controle. Valores expressos como média ± EPM de 6 a 7 experimentos.

ND = não determinado.

Em cada grupo experimental, as diferentes letras indicam que os valores diferem significativamente entre si ao nível de 0,05 pelo teste de Newman Keuls.



**Figura 6** - Curvas concentração-efeito médias obtidas pelo método cumulativo à noradrenalina, na ausência e presença de concentrações crescentes (30-800  $\mu\text{g/mL}$ ) do EBHA de *E. uniflora* no **ducto deferente (A)** e na **aorta torácica (B)** isolados de rato. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM de 4 a 6 experimentos.

**Tabela VI - Efeito do EBHA de *E. uniflora* (30-800 µg/mL) sobre as respostas contráteis à noradrenalina no ducto deferente e anéis de aorta torácica com endotélio, isolados de rato**

DUCTO DEFERENTE			AORTA TORÁCICA		
GRUPOS (µg/mL)	CE <sub>50%</sub> (µM) <sup>(1)</sup>	Efeito (%) <sup>(2)</sup>	GRUPOS (µg/mL)	CE <sub>50%</sub> (µM) <sup>(1)</sup>	Efeito (%) <sup>(2)</sup>
Controle	2,11 (1,17 - 3,81) <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	Controle	0,08 (0,02 - 0,37) <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
100	4,23 (3,16 - 5,68) <sup>b</sup>	87,86 ± 2,86 <sup>b</sup>	30	0,04 (0,01 - 0,13) <sup>a</sup>	68,04 ± 3,96 <sup>b</sup>
200	3,41 (2,80 - 4,16) <sup>b,a</sup>	65,47 ± 2,67 <sup>c</sup>	100	0,13 (0,04 - 0,4) <sup>a</sup>	31,15 ± 3,31 <sup>c</sup>
400	2,53 (1,48 - 4,32) <sup>b,a</sup>	56,96 ± 4,36 <sup>c</sup>	300	ND	22,27 ± 4,89 <sup>d</sup>
800	ND	25,29 ± 3,24 <sup>d</sup>	-	-	-

<sup>(1)</sup> Média geométrica das concentrações molares do agonista que produz 50% da resposta máxima, em experimentos individuais, com seus respectivos intervalos de confiança para 95% de probabilidade.

<sup>(2)</sup> Efeito da concentração máxima expresso como % do respectivo controle. Valores expressos como média ± EPM de 4 a 6 experimentos.

ND = não determinado.

Em cada grupo experimental, as diferentes letras indicam que os valores diferem significativamente entre si ao nível de 0,05 pelo teste de Newman Keuls.

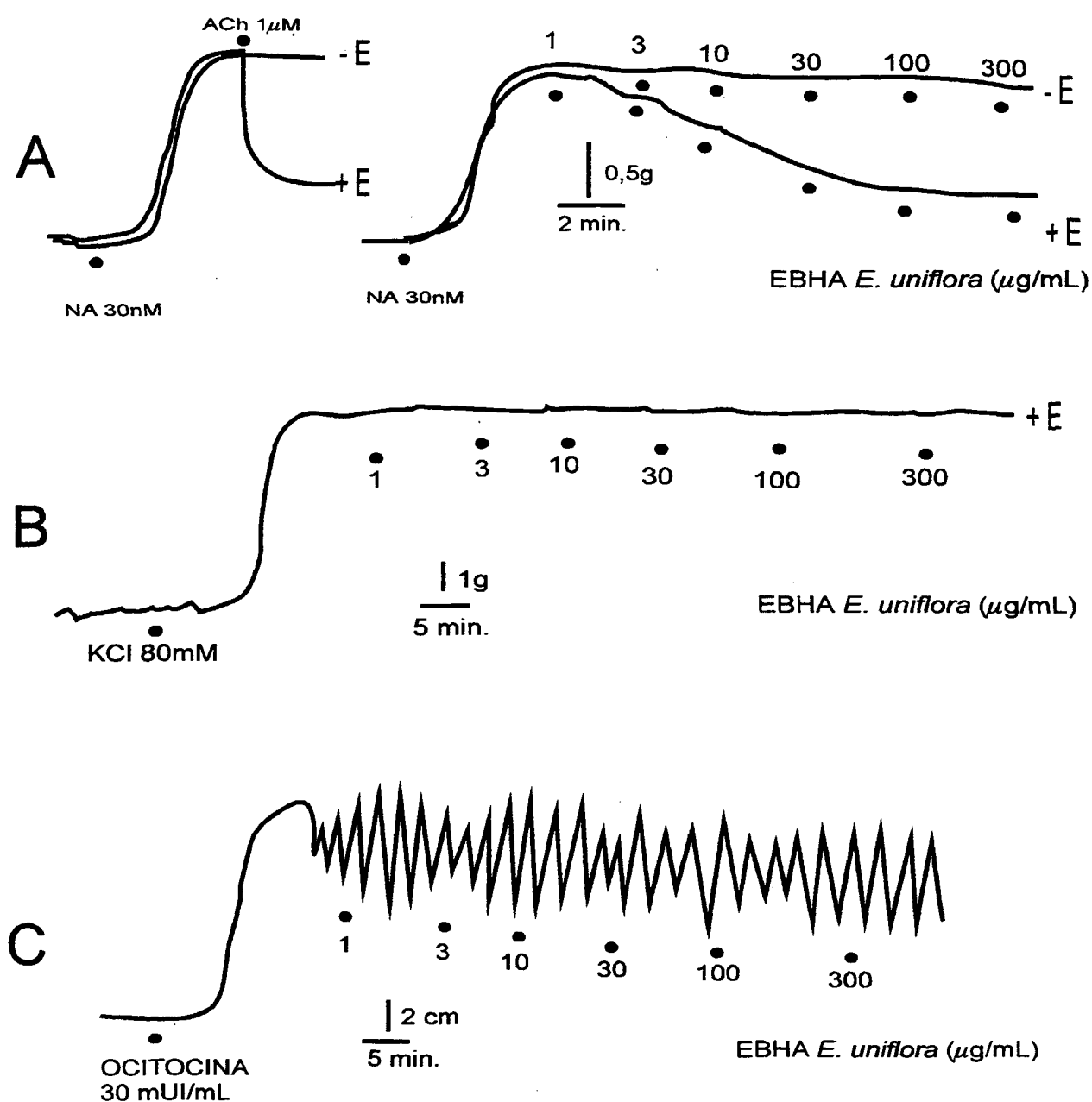
**Tabela VII - Efeito inibitório do EBHA de *E. uniflora* em preparações de musculatura lisa isolada**

<b>PREPARAÇÕES</b>	<b>AGONISTAS</b>	<b>CI<sub>50</sub><sup>(1)</sup> (µg/mL)</b>
Íleo de cobaia	acetilcolina	130 (80 - 190)
	histamina	110 (100 - 130)
Útero de rata	ocitocina	150 (130 - 170)
	acetilcolina	190 (130 - 290)
Ducto deferente de rato	noradrenalina	390 (300 - 500)
Aorta torácica de rato	noradrenalina	58 (53 - 63)

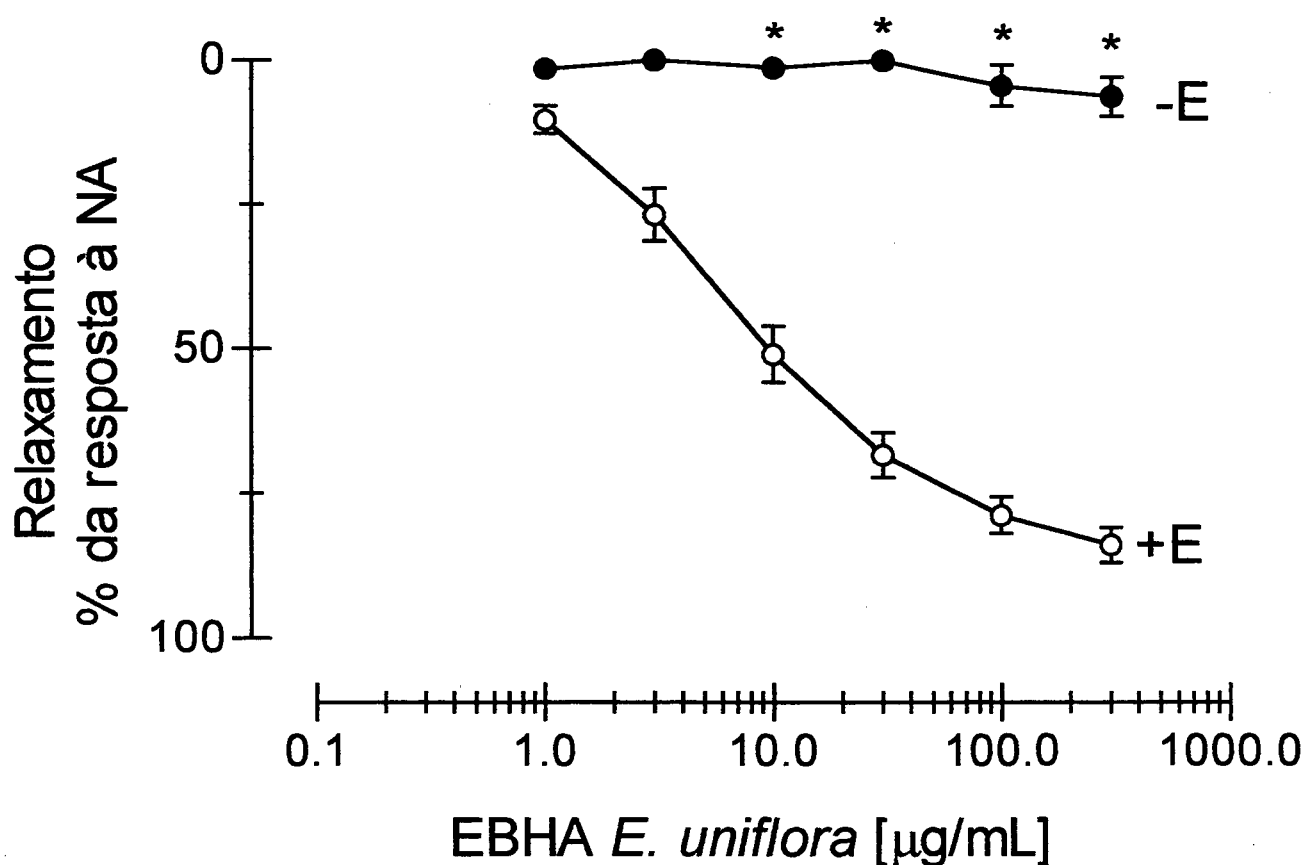
<sup>(1)</sup> Média geométrica das concentrações (µg/mL) do EBHA de *E. uniflora* que causaram uma inibição de 50% das respostas máximas contráteis induzidas por agonistas, com seus respectivos intervalos de confiança para 95% de probabilidade.

#### 4.2.3. Análise da resposta relaxante da aorta torácica isolada de rato previamente contraída com noradrenalina ou $K^+$ ao EBHA de *E. uniflora*

A adição de concentrações crescentes e cumulativas (1 a 300  $\mu\text{g/mL}$ ) do EBHA de *E. uniflora* à preparação contraída previamente com noradrenalina (30-100 nM) causou uma resposta relaxante concentração-dependente, dos anéis de aorta torácica de rato com endotélio íntegro (Figura 7 A). Os valores da  $CI_{50}$ , com seus respectivos limites de confiança e de relaxamento máximo, foram de 7,02 (4,77 - 10,00  $\mu\text{g/mL}$ ) e  $83,94 \pm 3,04\%$ , respectivamente. A remoção do endotélio reduziu o relaxamento induzido pelas mesmas concentrações do EBHA de *E. uniflora* para  $6,19 \pm 3,30\%$  (Figura 8). Da mesma forma, nos anéis desprovidos de endotélio, não houve resposta relaxante à acetilcolina (1  $\mu\text{M}$ ). Por outro lado, o EBHA de *E. uniflora* não relaxou os anéis de aorta torácica de rato com endotélio íntegro, contraídos previamente com potássio (40, 60 ou 80 mM) (Figura 7 B). Para estudo comparativo, foi feita uma curva concentração-resposta cumulativa ao EBHA de *E. uniflora* em útero isolado de rata contraído previamente com ocitocina (30 mUI/mL) (Figura 7 C). Neste último experimento, não foi observado o efeito relaxante do EBHA, como foi observado na aorta previamente contraída com noradrenalina.



**Figura 7** - Registros experimentais típicos ilustrando: relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* (1-300  $\mu\text{g/mL}$ ) em preparações de **aorta torácica de rato**: **A)** com (+E) ou sem (-E) endotélio, contraídas previamente com noradrenalina (NA 30 nM); **B)** em preparações com (+E) contraídas previamente com KCl (80 mM); ou **C)** de **útero isolado de rata** contraídas previamente com ocitocina (30 mUI/mL).



**Figura 8** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato contraídos previamente com noradrenalina (NA, 10-300 nM) com endotélio íntegro (+E) e lesado (-E). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 19 experimentos e os asteriscos indicam diferença significativa \*  $P \leq 0,0001$  quando comparados ao valor correspondente da curva com +E (teste “*t*” de Student).

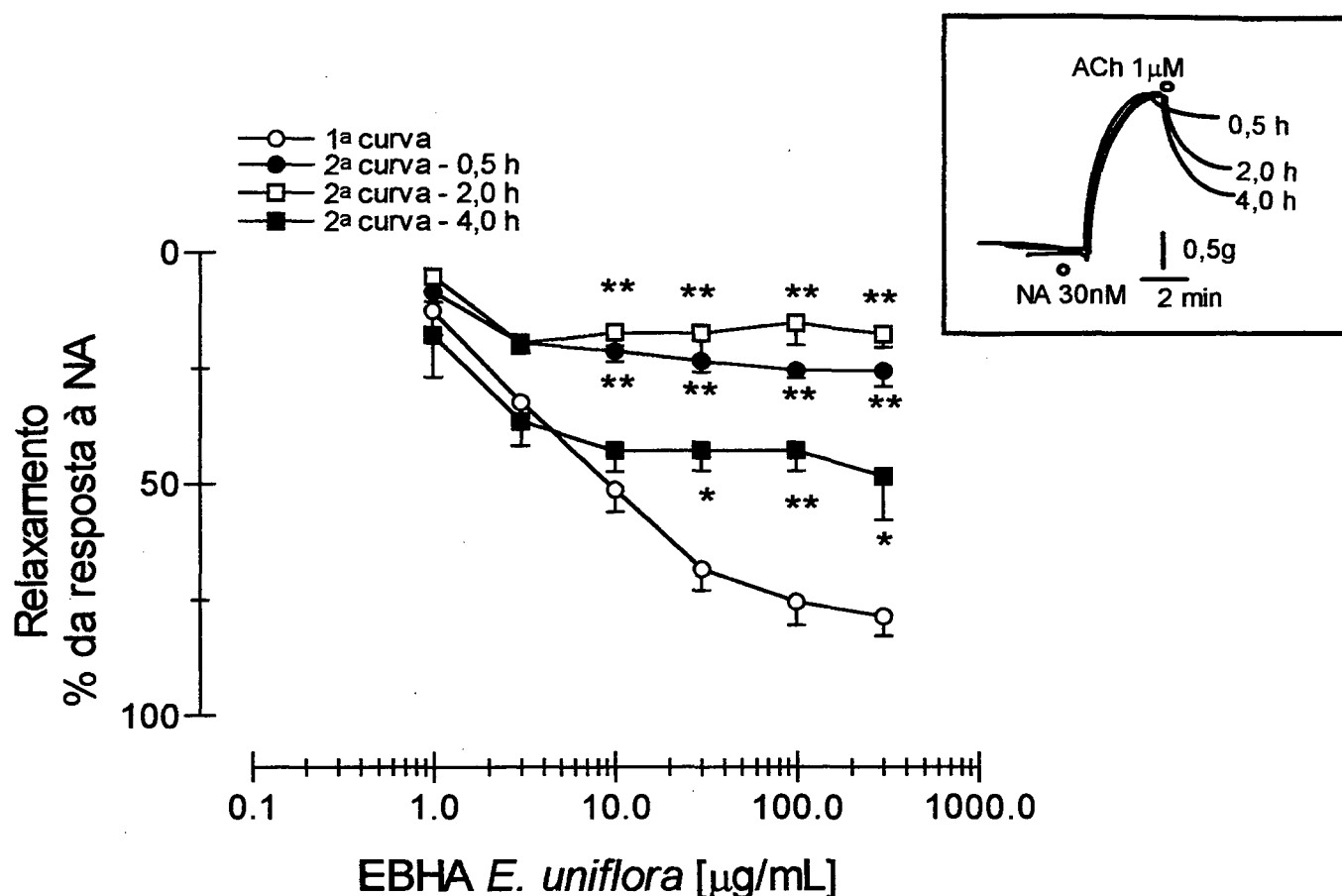


#### 4.2.4. Influência da exposição prévia ao EBHA de *E. uniflora* no relaxamento da aorta torácica isolada de rato

Após as primeiras curvas concentração-resposta ao EBHA de *E. uniflora*, as preparações foram lavadas a cada 15 min, sendo que as segundas curvas foram obtidas com intervalos de 30 min, 2 e 4 h em relação à primeira, em anéis de aorta torácica com endotélio íntegro. Decorridos 30 min, 2 e 4 h após a primeira curva relaxante ao EBHA de *E. uniflora*, as segundas curvas apresentaram, respectivamente, um relaxamento médio máximo de  $25,59 \pm 3,41\%$ ;  $17,75 \pm 2,77\%$  e  $48,46 \pm 9,50\%$  (Figura 9). Assim, o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora* foi reduzido, especialmente após 30 min e 2 horas e recuperado parcialmente após 4 horas, sugerindo um efeito taquifilático do EBHA de *E. uniflora*.

Os intervalos de tempo entre a primeira e a segunda curva relaxante do EBHA de *E. uniflora* também afetaram a resposta máxima à ACh: decorridos 30 min o efeito foi praticamente inexistente; após 2 e 4 horas o relaxamento foi de  $36,95 \pm 6,42\%$  e  $56,55 \pm 7,49\%$ , respectivamente (desenho inserido na Figura 9).

Ao término dos experimentos, após a segunda curva de relaxamento concentração-dependente ao EBHA de *E. uniflora*, com intervalos de 30 min, as preparações foram submetidas ao efeito do nitroprussiato de sódio (NPS,  $1 \mu\text{M}$ ), sendo obtidos relaxamentos de  $100,00 \pm 0,00\%$ . Assim, a segunda curva concentração-resposta do EBHA de *E. uniflora*, com intervalo de 30 min, não interferiu no efeito relaxante do NPS, mas, sim com a resposta da ACh.



**Figura 9** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300 µg/mL) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, contraídos previamente com noradrenalina (NA, 10-300 nM). As segundas curvas foram registradas após 0,5 (●), 2 (□) e 4 h (■) de intervalo das primeiras curvas (○). Cada ponto representa a média ± EPM de 4 a 10 experimentos e os asteriscos indicam diferença significativa \*  $P \leq 0,01$  e \*\*  $P \leq 0,001$  quando comparados ao valor correspondente à primeira curva de relaxamento (teste “*t*” de Student).

A figura na parte superior do gráfico demonstra o relaxamento induzido pela ACh (1 µM) após a segunda curva do extrato em 0,5, 2 e 4 h de intervalo, na aorta torácica de rato contraída previamente com NA (10-300 nM).

#### 4.2.5. Possível participação da via do óxido nítrico sobre a resposta relaxante da aorta torácica isolada de rato ao EBHA de *E. uniflora*

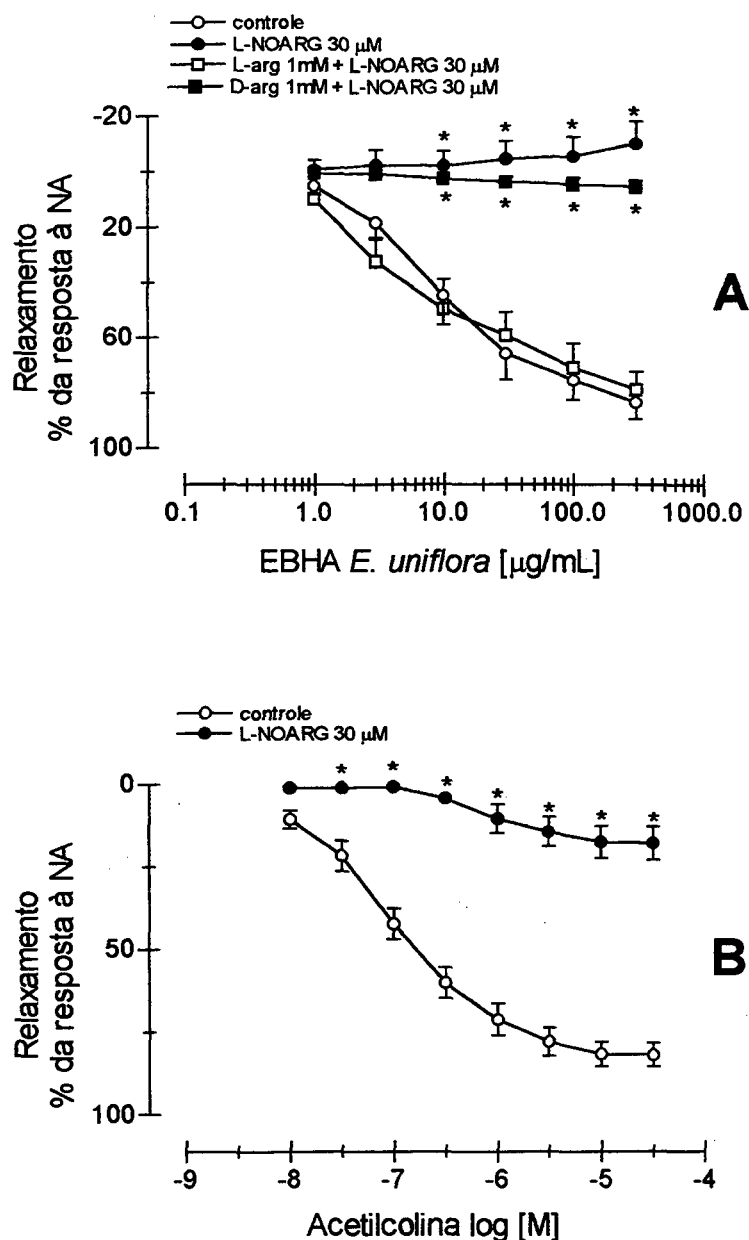
A incubação prévia, por 20 min, dos anéis de aorta torácica isolada com N<sup>w</sup> nitro-L-arginina (L-NOARG, 30  $\mu$ M) e seu metil éster, a N<sup>w</sup> nitro metil éster L-arginina (L-NAME, 30  $\mu$ M) (Figuras 10 e 11) produziu um bloqueio pronunciado do relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora*. A L-NOARG não apenas inibiu significativamente o relaxamento máximo induzido pelo EBHA de *E. uniflora*, como também permitiu que o extrato contraísse as preparações ( $R_{\max}$  -10,43  $\pm$  7,81%). Da mesma forma, na presença de L-NAME, o EBHA de *E. uniflora* produziu um relaxamento máximo ( $R_{\max}$ ) de -3,69  $\pm$  2,62%. Por outro lado, a N<sup>G</sup> monometil-L-arginina (L-NMMA, 300  $\mu$ M) não apresentou efeito sobre o relaxamento induzido pelo extrato (Figura 12).

A adição do substrato endógeno L-arginina (1 mM,  $R_{\max}$  78,78  $\pm$  6,53%), mas não o seu enantiômero, a D-arginina (1mM,  $R_{\max}$  5,10  $\pm$  2,39%), reverteu completamente o efeito inibitório produzido pela L-NOARG sobre o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora* (Figura 10). A capacidade da L-NAME em bloquear o relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* não foi anulada com o tratamento prévio com L-arginina (1 e 10 mM) (Figura 11).

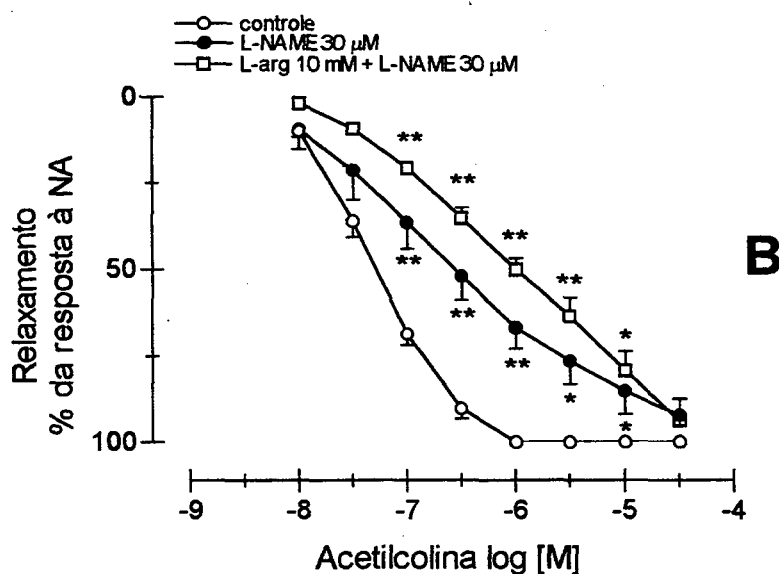
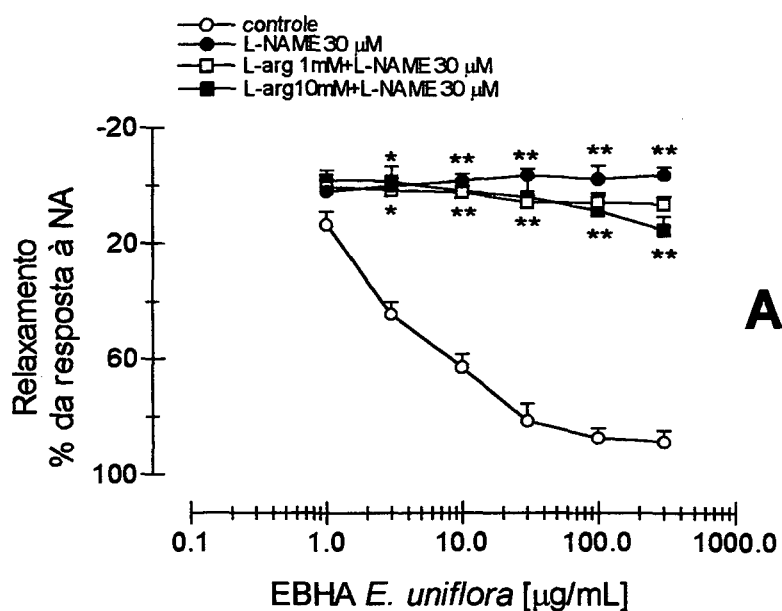
No relaxamento induzido pela acetilcolina, em aorta torácica de rato, contraída previamente com noradrenalina, a L-NOARG igualmente apresentou um

bloqueio significativo ( $R_{\max}$   $17,83 \pm 5,07\%$ ; Figura 10). A incubação com L- NAME deslocou a curva dose-resposta à ACh significativamente para a direita; no entanto, a incubação prévia da L-arginina (10 mM) não alterou o seu efeito (Figura 11) e o L-NMMA não afetou o relaxamento da acetilcolina (Figura 12).

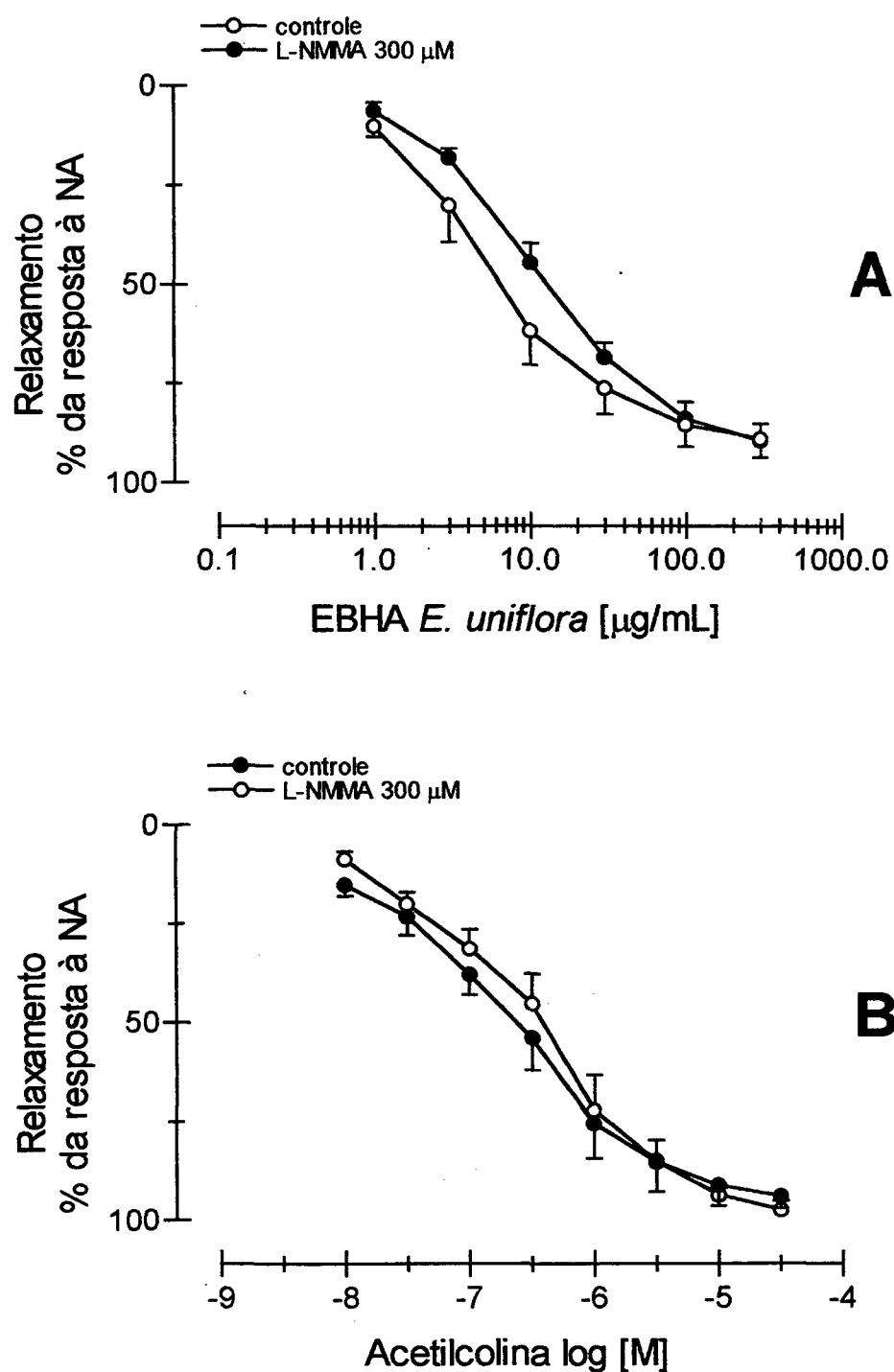
O tratamento prévio com azul de metileno (30  $\mu$ M) (Figura 13), inibidor da guanilato ciclase solúvel, apresentou um efeito similar ( $R_{\max}$   $14,60 \pm 7,40\%$ ) ao causado pela L-NOARG e L-NAME, ou seja, uma inibição acentuada do efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora*.



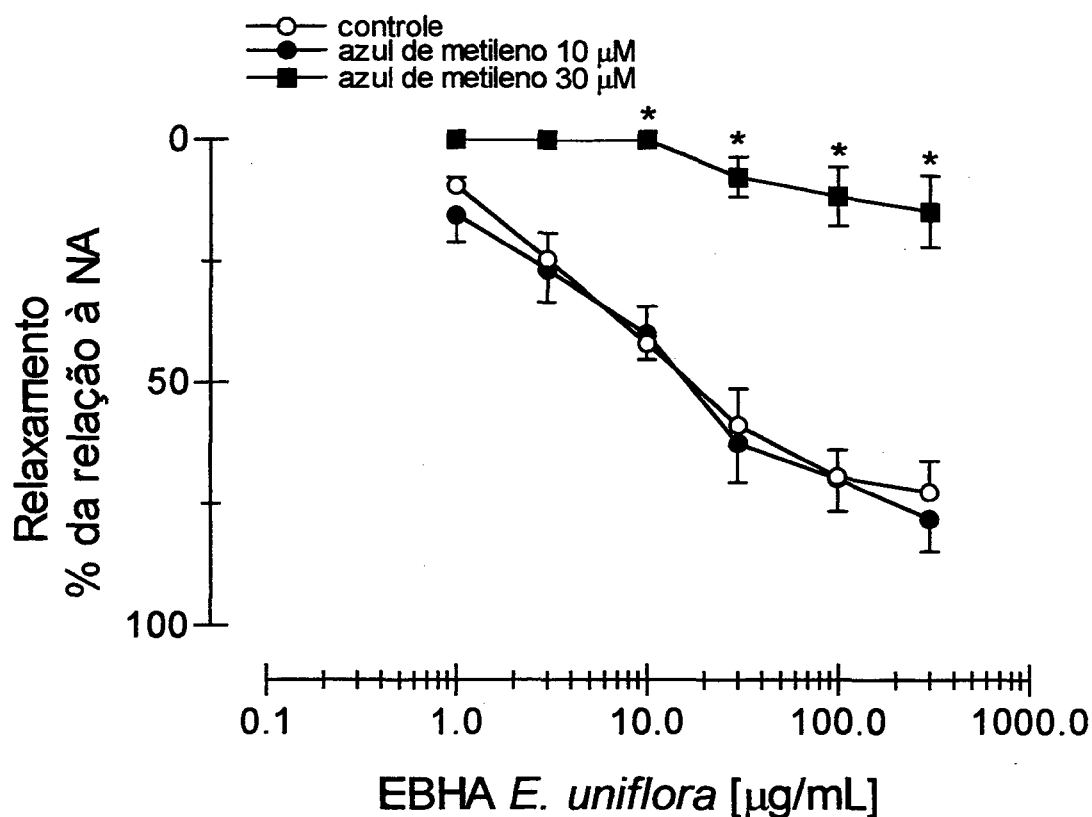
**Figura 10** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300  $\mu\text{g/mL}$ ) (A) e à acetilcolina (0,01-30  $\mu\text{M}$ ) (B), em anéis de **aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro** previamente contraídos com noradrenalina (NA, 30-100 nM) na ausência e na presença de L-NOARG (30  $\mu\text{M}$ ), L-NOARG (30  $\mu\text{M}$ ) + L-arginina (L-arg 1 mM) e L-NOARG (30  $\mu\text{M}$ ) + D-arginina (D-arg 1 mM). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 11 experimentos. Os asteriscos indicam diferença significativa \*  $P \leq 0,01$  quando comparados ao valor correspondente do grupo controle (teste “*t*” de Student).



**Figura 11** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300  $\mu\text{g/mL}$ ) (A) e à acetilcolina (0,01-30  $\mu\text{M}$ ) (B) em anéis de **aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro**, contraídos previamente com noradrenalina (NA, 10-300 nM) na ausência e presença de L-NAME (30  $\mu\text{M}$ ) e L-arginina (1 ou 10 mM) + L-NAME (30  $\mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média de 4 a 6 experimentos. Os asteriscos indicam diferença significativa \*  $P \leq 0,05$  e \*\*  $P \leq 0,001$  quando comparados ao valor correspondente do grupo controle (teste “*t*” de Student).



**Figura 12** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300 $\mu\text{g/mL}$ ) (A) e à acetilcolina (0,01-30  $\mu\text{M}$ ) (B) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, contraídos previamente com noradrenalina (NA, 10-300 nM), na ausência e presença de L-NMMA (300  $\mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 7 experimentos.



**Figura 13** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300  $\mu\text{g/mL}$ ) em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, previamente contraídos com noradrenalina (NA, 10-300 nM) na ausência e presença de azul de metileno (10 a 30  $\mu\text{M}$ ). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 5 a 8 experimentos. Os asteriscos indicam diferença significativa  $*P \leq 0,001$  quando comparados ao valor correspondente do grupo controle (teste “*t*” de Student).



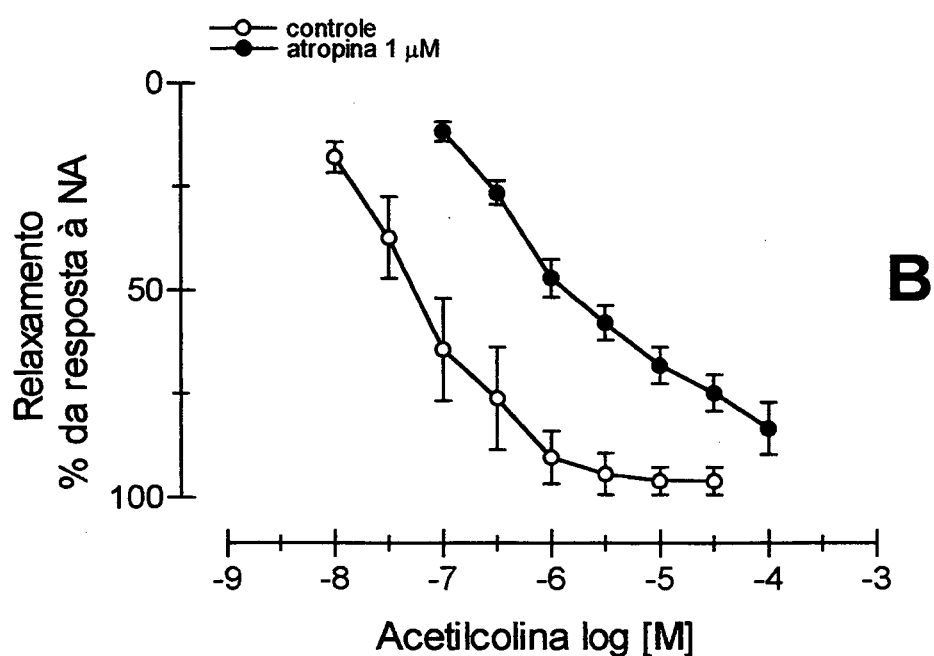
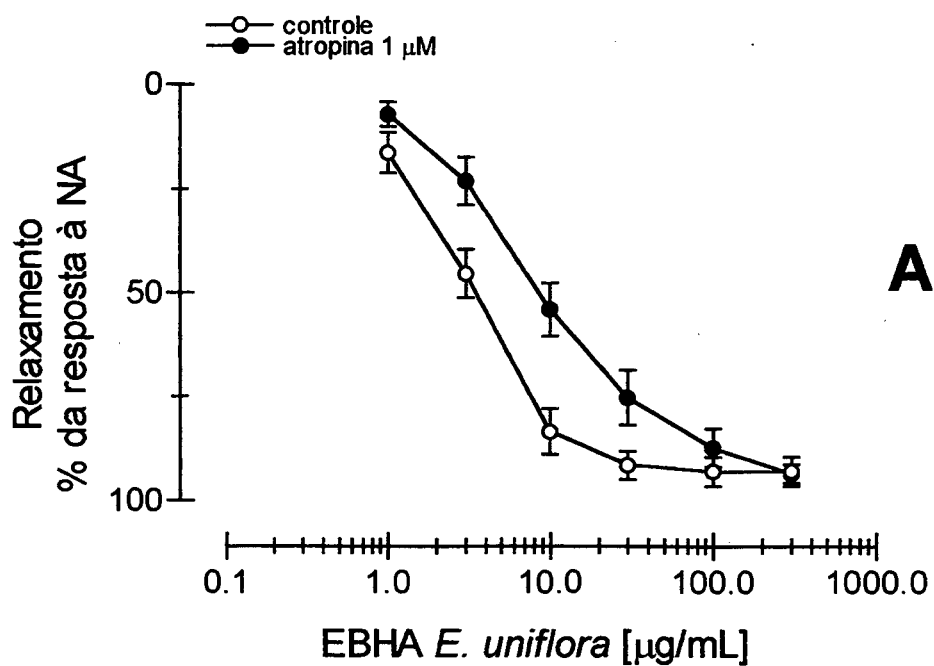
#### 4.2.6. Estudo de outras drogas sobre o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora*, em aorta torácica isolada de rato

A curva concentração-resposta ao EBHA de *E. uniflora* foi deslocada para a direita na presença de 1  $\mu\text{M}$  de atropina, sem alterar o relaxamento máximo; porém, este deslocamento não foi estatisticamente significativo. O valor da  $\text{CI}_{50}$  na ausência de 1  $\mu\text{M}$  de atropina foi de 1,84 (0,46-7,31)  $\mu\text{g/mL}$  e na presença desta foi de 7,37 (5,40-10,05)  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela VIII). No controle paralelo com a acetilcolina, na ausência de atropina, foram obtidos valores de  $\text{CI}_{50}$  de 6,13 (1,69-22,1)  $\mu\text{g/mL}$  e de  $\text{R}_{\text{max}}$  de  $96,15 \pm 3,33\%$ . Já a concentração de 1  $\mu\text{M}$  de atropina deslocou a curva concentração-resposta à ACh para a direita com valores de  $\text{CI}_{50} = 1,02$  (0,78-1,34)  $\mu\text{g/mL}$  e de  $\text{R}_{\text{max}} = 83,48 \pm 6,27\%$ , demonstrando antagonismo muscarínico competitivo, na aorta torácica isolada de rato (Figura 14).

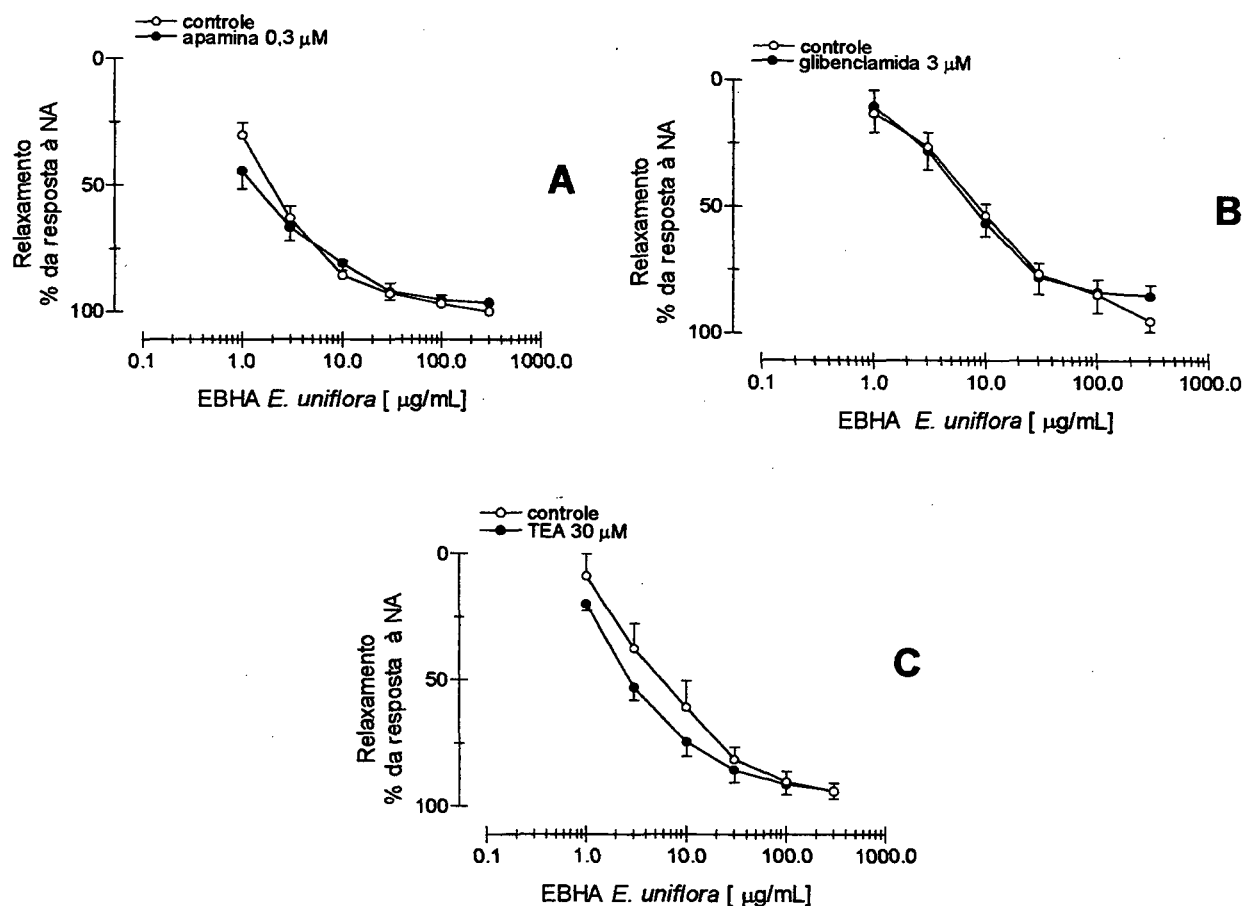
A incubação prévia com a apamina (0,3  $\mu\text{M}$ ), bloqueador de canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ , não interferiu no relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora*. Da mesma forma, a glibenclamida (3  $\mu\text{M}$ ), bloqueador de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis à ATP e o tetraetilamônio (30  $\mu\text{M}$ ), que atua de forma não-seletiva em canais de  $\text{K}^+$ , não afetaram o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora* na aorta torácica isolada de rato com endotélio (Figura 15). A pirilamina (1  $\mu\text{M}$ ),

o propranolol (1  $\mu\text{M}$ ) e a indometacina (1 e 10  $\mu\text{M}$ ) demonstraram não afetar o efeito do EBHA de *E. uniflora* sobre a aorta torácica isolada de rato, sugerindo que o relaxamento não está relacionado à ação da histamina, nem à ativação de  $\beta$ -adrenoceptores ou à via da ciclooxigenase do ácido araquidônico (Figura 16).

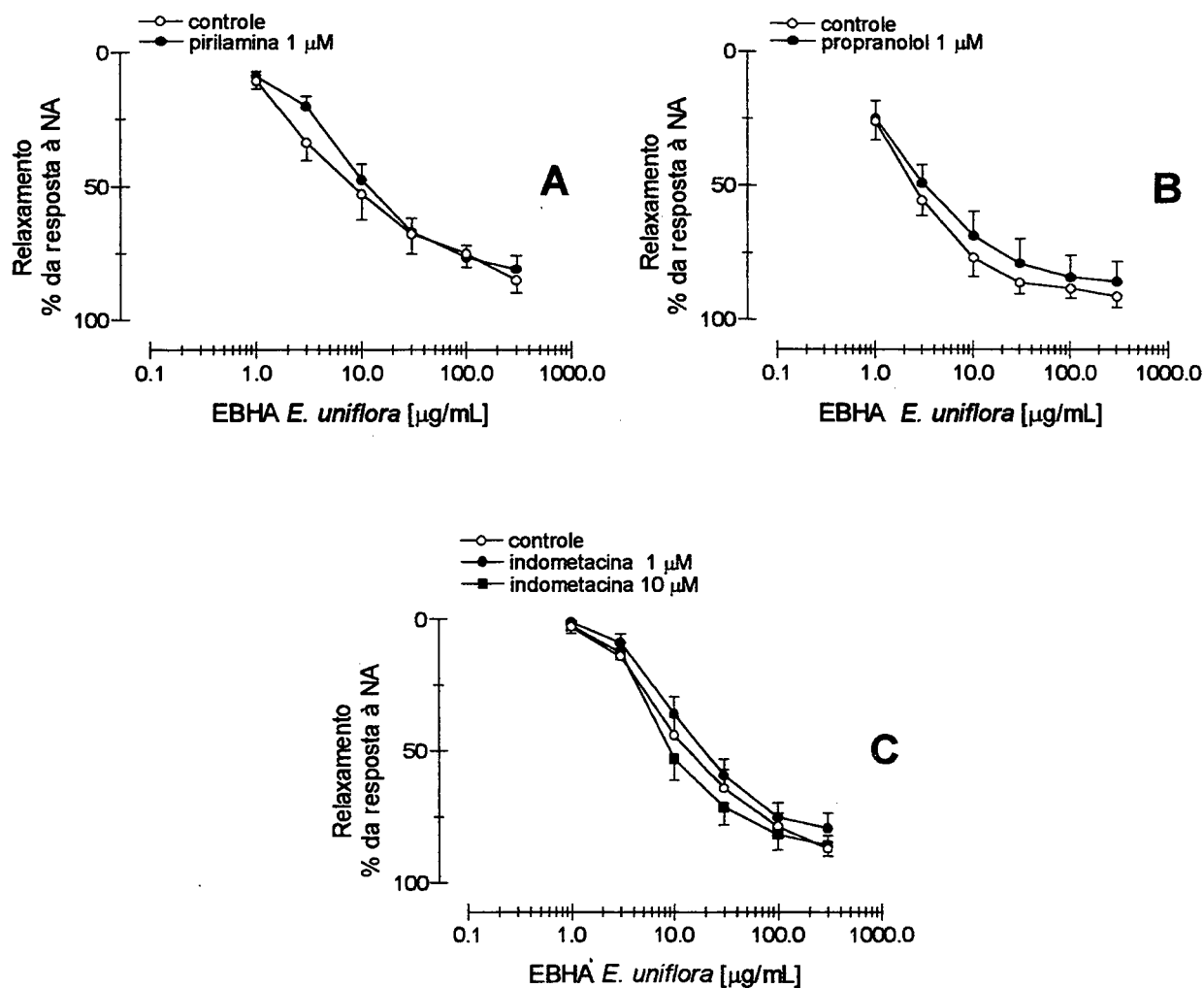
Os valores percentuais de relaxamento máximo ( $R_{\text{max}}$ ), bem como os valores de  $\text{CI}_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança, das curvas concentração-resposta ao EBHA de *E. uniflora*, na ausência e presença das diferentes drogas, encontram-se na Tabela VIII.



**Figura 14** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300 µg/mL) (A) e à acetilcolina (0,01-100 µM) (B) em anéis de **aorta torácica de rato com endotélio íntegro**, previamente contraídos com noradrenalina (NA, 10-300 nM) na ausência e presença de 1 µM de atropina. Cada ponto representa a média ± EPM de 4 a 13 experimentos.



**Figura 15** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300 μg/mL) em anéis de aorta torácica de rato com endotélio íntegro, previamente contraídos com noradrenalina (NA, 30-100 nM), na ausência e na presença de apamina (0,3 μM) (A), glibenclamida (3 μM) (B) e tetraetilamônio (TEA, 30 μM) (C). Cada ponto representa a média ± EPM de 4 a 6 experimentos.



**Figura 16** - Curvas concentração-relaxamento médias ao EBHA de *E. uniflora* (1-300 μg/mL) em anéis de aorta torácica de rato com endotélio íntegro, previamente contraídos com noradrenalina (NA 30-100 nM), na ausência e na presença de: pirilamina (1 μM) (A), propranolol (1 μM) (B) e indometacina (1 e 10 μM) (C). Cada valor representa a média ± EPM de 4 a 8 experimentos.

**Tabela VIII - Efeitos de diferentes drogas sobre o relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* na aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro**

DROGA	CONCEN- TRAÇÃO $\mu\text{M}$	AUSÊNCIA		PRESENÇA	
		$\text{CI}_{50}^{(1)}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{R}_{\text{max}}^{(2)}$ (%)	$\text{CI}_{50}^{(1)}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\text{R}_{\text{max}}^{(2)}$ (%)
atropina	1	1,84 (0,46-7,31)	93,13 $\pm$ 3,56	7,37(5,40-10,05)	93,65 $\pm$ 2,25
apamina	0,3	1,35 (0,86-2,13)	100,00 $\pm$ 0,00	2,29 (1,29-4,06)	96,39 $\pm$ 1,51
glibenclamida	3	8,73 (5,10-14,95)	95,37 $\pm$ 4,29	5,28 (3,19-8,74)	85,50 $\pm$ 4,31
tetraetilamônio	30	4,25 (2,58-7,02)	94,12 $\pm$ 3,21	1,85(1,19-2,87)	94,03 $\pm$ 3,20
pirilamina	1	5,05 (1,94-13,15)	84,83 $\pm$ 4,80	7,59 (4,98-11,59)	80,82 $\pm$ 5,10
propranolol	1	1,60 (1,22-2,12)	91,19 $\pm$ 4,02	2,50 (2,03-3,06)	85,58 $\pm$ 7,39
indometacina	1	5,65 (2,47-12,91)	96,61 $\pm$ 2,02	5,12 (1,50-17,41)	96,77 $\pm$ 2,05

<sup>(1)</sup> $\text{CI}_{50}$  é apresentada como média geométrica acompanhada pelo seu limite de confiança de 95%.

<sup>(2)</sup> $\text{R}_{\text{max}}$  é apresentada como média  $\pm$  EPM, referente ao % do efeito máximo de relaxamento.

Cada grupo representa a média de 5 a 13 experimentos.

#### 4.2.7. Resposta relaxante da aorta torácica isolada de rato às frações aquosa e acetato de etila do EBHA de *E. uniflora*

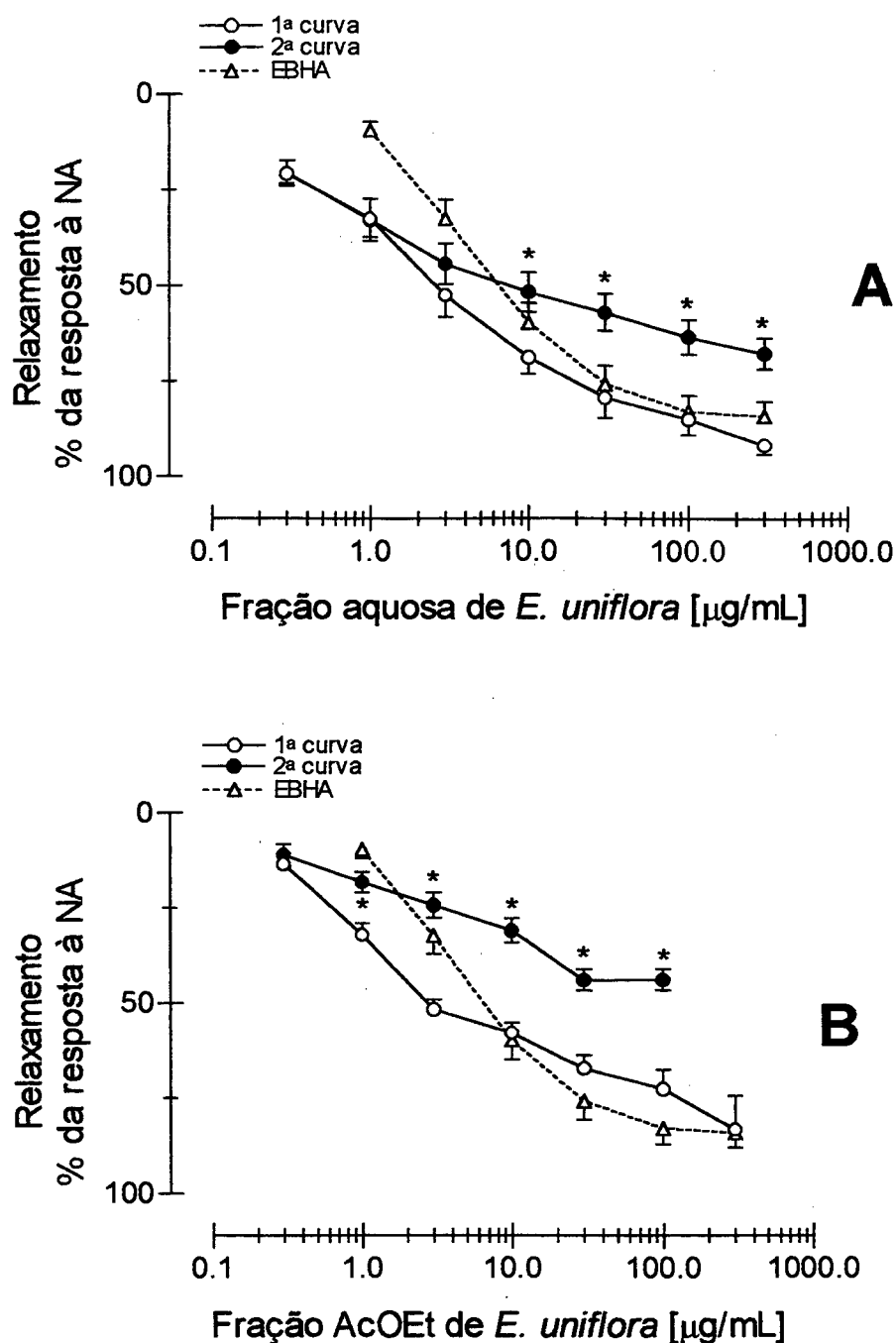
Na aorta torácica isolada de rato, previamente contraída com noradrenalina (10-300 nM), a primeira curva concentração-resposta à fração aquosa, apresentou um relaxamento máximo de  $91,76 \pm 2,44\%$  e uma  $CI_{50}$  de 1,99 (1,15-3,45)  $\mu\text{g/mL}$ . Decorridos 30 min, a segunda curva demonstrou um efeito relaxante máximo em torno de  $67,76 \pm 4,06\%$  e  $CI_{50}$  de 1,39 (0,60-3,24)  $\mu\text{g/mL}$ . (Figura 17).

A média de relaxamento máximo para a primeira curva da fração acetato de etila foi de  $83,29 \pm 8,79\%$ , com  $CI_{50}$  de 2,05 (0,62-6,79)  $\mu\text{g/mL}$  e, para a segunda, decorridos 30 min após a primeira, um  $R_{\text{max}}$  de  $44,05 \pm 2,78\%$ , com  $CI_{50}$  de 1,54 (0,57-4,17)  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 17).

A fração diclorometano, por sua vez, não relaxou as preparações de aorta torácica de rato com endotélio íntegro.

O relaxamento da ACh após a segunda curva da fração aquosa foi de  $74,85 \pm 7,36\%$  e para a fração acetato de etila de  $39,51 \pm 9,24\%$ .

As diferenças quanto ao efeito relaxante entre as primeiras curvas das frações aquosa e acetato de etila não foram consideráveis. No entanto, ao comparar as segundas curvas das duas frações, pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa ( $P \leq 0,01$ ) na resposta máxima relaxante sugerindo que, ainda na fração acetato de etila permaneceu um efeito taquifilático, porém, menor do que em relação ao EBHA de *E. uniflora*.



**Figura 17** - Curvas concentração-relaxamento médias para concentrações crescentes (0,3-300  $\mu\text{g/mL}$ ) das frações aquosa (A) e acetato de etila (AcOEt) (B), em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, previamente contraídos com noradrenalina (NA, 10-300 nM). As segundas curvas (●) foram registradas decorridos 30 min após as primeiras (○). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM de 4 a 12 experimentos. Os asteriscos indicam diferença significativa \*  $P \leq 0,05$  quando comparados ao valor correspondente da primeira curva de relaxamento (teste "t" de Student). As linhas tracejadas indicam o relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* (1-300  $\mu\text{g/mL}$ ).



## 5 - DISCUSSÃO

É necessário que as plantas medicinais nativas, que vêm sendo usadas indiscriminadamente pela população, sejam alvo de estudos fitoquímicos, farmacológicos pré-clínicos, clínicos e, ainda, toxicológicos. Somente com base nos resultados destas avaliações e congregando ainda estudos tecnológicos que visem garantir a qualidade das preparações à base de plantas medicinais, poder-se-á validar cientificamente o seu uso e estas poderão ser consideradas verdadeiramente como medicamentos.

Com este espírito, objetivou-se contribuir com o estudo farmacológico de uma planta nativa, a pitangueira, utilizada pela população como hipoglicemiante. Neste sentido, este trabalho foi realizado inicialmente com o objetivo de avaliar a ação hipoglicemiante do extrato das folhas deste vegetal e, de forma complementar, de investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos em processos relacionados ao diabetes, como é o caso da aterosclerose e hipertensão, que parecem comprometer o relaxamento vascular.

A estreptozotocina (STZ), utilizada para induzir o diabetes nos animais, é um antibiótico de amplo espectro produzido por *Streptomyces achromogenes* (Rakieten *et al.*, 1963; Gunnarsson *et al.*, 1974, Like e Rossini, 1976). A STZ apresenta um grupamento nitrosuréia em sua molécula e a conseqüente produção exacerbada de NO, após a administração desta droga, é considerada tóxica às células  $\beta$

pancreáticas (Tanaka *et al.*, 1995). Além disso, no interior das células  $\beta$ , a nitrosuréia pode inibir a atividade da superóxido dismutase, permitindo o acúmulo de radicais livres tóxicos a estas células (Fischer e Hamburger, 1979; Robbins *et al.*, 1980; Grankvist *et al.*, 1981). Sabe-se ainda que a perda da potência diabetogênica da STZ está correlacionada com a redução da produção de nitrito (Tanaka *et al.*, 1995).

De acordo com os resultados obtidos, o EBHA de *E. uniflora* não pode ser considerado antidiabetogênico, quando administrado em doses repetidas, e o mecanismo, através do qual o extrato interferiu no menor ganho de peso dos animais tratados, não pode ser elucidado somente com os experimentos realizados neste trabalho. Os ratos tratados com o EBHA de *E. uniflora*, tanto os normais quanto os diabéticos, ingeriram menor quantidade de água e excretaram menor volume de urina do que os seus respectivos controles, durante o experimento o que, no entanto, não foi estatisticamente significativo (dados não apresentados). Este fato permite supor que o EBHA não apresentou efeito diurético, descartando ainda a hipótese de uma possível desidratação causada pelo extrato, que por sua vez, pudesse interferir com o menor peso dos animais tratados. Quando a ingesta alimentar foi relacionada ao peso corporal (por 100 g) dos ratos (dados não demonstrados), não foi registrada uma diferença estatisticamente significativa, entre os grupos e os seus respectivos controles, que pudesse sugerir uma ação anoréxica do EBHA de *E. uniflora*.

Assim sendo, postulou-se que os taninos existentes no EBHA de *E. uniflora* poderiam interferir na absorção intestinal de nutrientes quando ingeridos repetidamente. No entanto, tal hipótese necessita de uma posterior comprovação. A literatura refere que os taninos podem exercer efeitos antinutricionais, tendo sido observado um menor ganho de peso nos animais que receberam dietas ricas em taninos, e também um aumento na excreção de nitrogênio fecal (Butler e Rogler, 1992).

Nos experimentos *in vitro*, a incubação prévia de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* inibiu, de forma não-competitiva e concentração-dependente, as respostas contráteis máximas do íleo de cobaia à acetilcolina e à histamina; do útero de rata à acetilcolina e à ocitocina; no ducto deferente e aorta de rato à noradrenalina.

Várias substâncias de origem vegetal podem ter seu local de ação no meio intracelular interferindo com os mecanismos de transdução, através dos quais os receptores são acoplados aos sistemas que regulam a função celular. O antagonismo não-competitivo do EBHA de *E. uniflora* permitiu supor que um dos locais de ação das substâncias ativas deste extrato poderia ser o meio intracelular, interferindo com a transdução.

A sensibilidade foi alterada significativamente à acetilcolina, na concentração de 100 e 200 µg/mL e, à histamina, na concentração de 200 µg/mL do EBHA de

*E. uniflora* no íleo isolado de cobaia, sugerindo um possível envolvimento colinérgico e histaminérgico.

Com o intuito de verificar se o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora* ocorria na musculatura lisa não-vascular, foram feitas curvas concentração-resposta com este extrato em útero de ratas virgens tratadas com estradiol (0,5 mg/kg s.c.), contraído previamente com ocitocina. A ocitocina age através da ativação da fosfolipase C, aumentando o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular via segundo mensageiro: 1,4,5 trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) (Phillippe, 1994) e também através do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , estimulando canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de receptor e de voltagem (Inoue *et al.*, 1992; Molnár e Hertelendy, 1995).

O NO está presente no útero de rata e contribui para seu relaxamento, mantendo a musculatura lisa uterina quiescente durante a gravidez, quando os níveis de progesterona estão elevados (Beilin e Chu, 1993; Sladek *et al.*, 1993; Weiner *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995). O NO foi produzido em cultura de tecidos uterinos, sendo os seus efeitos mimetizados pelo GMPc. Estas respostas ao GMPc foram aumentadas com a progesterona e diminuídas mediante o tratamento com estradiol (Yallampalli *et al.*, 1993 e 1994). A ausência do efeito relaxante por parte do EBHA de *E. uniflora*, no útero previamente contraído com ocitocina, provavelmente está associada ao nível de estradiol a que este órgão foi submetido. Assim sendo, com o objetivo de avaliar a possível ação do NO no útero de rata,

induzida pelo EBHA de *E. uniflora*, fica evidenciada a necessidade de experimentos posteriores com ratas na prenhez, quando os níveis de progesterona aumentam a produção de NO-GMPc.

Os experimentos realizados com a atropina demonstraram não haver significância da  $CI_{50}$ , quando comparada em relação ao seu respectivo controle; esse resultado sugere a não interferência de fatores muscarínicos no relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* na aorta de rato.

O relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* não foi afetado pela pirilamina (antagonista histaminérgico), pelo propranolol, o que sugeriu a não interferência de  $\beta$ -adrenoceptores, nem pela indometacina, que bloqueia a ciclooxigenase.

É conhecido que os canais de potássio que determinam o potencial da membrana celular possuem importante função do controle do tônus vascular. A hiperpolarização, seguida pela ativação de canais de  $K^+$ , reduz a probabilidade de abertura de canais de  $Ca^{2+}$  e resulta na diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  e no relaxamento do músculo liso (Dumont e Lamontagne, 1995; Hampl *et al.*, 1995). A apamina (antagonista de canais de potássio dependentes de  $Ca^{2+}$  sensíveis à voltagem, de baixa condutância), a glibenclamida (droga bloqueadora de canais de  $K^+$  dependentes de ATP) e também o tetraetilamônio (antagonista não-seletivo de canais de  $K^+$ ) não interferiram no relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora*.

Corrêa *et al.* (1991) também observaram que a glibenclamida não bloqueou o relaxamento induzido pela acetilcolina em aorta de rato com endotélio e que o NO foi o fator relaxante predominante.

O EBHA de *E. uniflora* e suas frações apresentaram efeito relaxante dependente de endotélio, em anéis de aorta torácica de rato, sugerindo uma interferência da via do NO.

A vasodilatação causada tanto pelo EBHA de *E. uniflora*, quanto pela ACh, foi significativamente bloqueada pela N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina (30 µM) e pela N<sup>w</sup>-nitro metil éster L-arginina (30 µM), que são inibidores da biossíntese de NO (Moore *et al.*, 1990; Wakabayashi *et al.*, 1994). Foi demonstrado ainda que, na aorta de rato, o NO é o fator relaxante predominante derivado do endotélio (Zygmunt *et al.*, 1994), sendo particularmente sensível ao efeito inibitório da L-NOARG sobre a resposta relaxante (Vargas *et al.* 1991).

A L-arginina (1 mM), substrato endógeno da óxido nítrico sintase, reverteu o bloqueio induzido pela L-NOARG (30 µM); no entanto, o seu enantiômero, a D-arginina (1 mM), não alterou o efeito da droga inibidora sobre a aorta torácica isolada de rato submetida a concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora*. O L-NAME também bloqueou a suposta produção de NO, estimulada tanto pelo extrato bruto quanto pela ACh; entretanto, o tratamento prévio com L-arginina (1 e 10 mM) não previniu esse efeito. Em outros experimentos, em preparações de corpo

cavernoso de coelho, o L-NAME (10  $\mu$ M) igualmente inibiu a resposta relaxante induzida pelo EBHA de *E. uniflora* que, no entanto, foi revertida com o tratamento de L-arginina (300  $\mu$ M) (dados não demonstrados). Ressalta-se que a procedência do L-NAME foi a mesma nos diferentes tipos de experimentos com este inibidor.

Nos experimentos de Randall e Griffith (1991), em preparações de orelha de coelho, o relaxamento induzido pela ACh foi bloqueado pelo L-NAME; no entanto, esse efeito também não foi revertido pela L-arginina. Os diferentes resultados sugeriram a possibilidade de heterogeneidade farmacológica nos mecanismos responsáveis pela conversão da L-arginina a NO. É provável que os efeitos dos inibidores da óxido nítrico sintase e sua capacidade de reversão pela L-arginina sejam influenciados pela espécie animal e pelos sistemas fisiológicos considerados.

O azul de metileno (30  $\mu$ M) inibiu a resposta relaxante da aorta torácica ao extrato. Ele bloqueia a guanilato ciclase solúvel (Martin *et al.*, 1985; Inoue *et al.*, 1991), induzindo a uma diminuição nos níveis basais do GMPc (Holzmann, 1982; Ignarro *et al.*, 1984); sugerindo assim o resultado obtido, a importância do mecanismo de transdução do GMPc para o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora*.

A N<sup>G</sup>monometil-L-arginina foi usada inicialmente para estabelecer o papel da L-arginina como o precursor para a formação de NO endotelial (Rees *et al.*, 1989a). Na traquéia isolada de cobaia, a incubação com L-NMMA inibiu de forma concentração-dependente o relaxamento induzido pela bradicinina (Schlemper e

Calixto, 1994). Em oposição à ação dos demais bloqueadores do NO, nos experimentos deste trabalho, o L-NMMA (300  $\mu$ M) não apresentou efeito sobre o relaxamento induzido, tanto pela ACh quanto pelo EBHA de *E. uniflora*, na aorta isolada de rato. Com base nos experimentos de Archer e Hampl (1992), o L-NMMA foi considerado como agonista parcial, pois a droga aumentou a síntese do NO na artéria pulmonar e em anéis aórticos. Esse mesmo efeito não foi observado na presença de L-NOARG, pelos mesmos autores, nas referidas preparações. Thomas e Ramwell (1992) observaram que a concentração de 100  $\mu$ M de L-NMMA inibiu o relaxamento endotélio dependente em aorta de rato, efeito este que foi atenuado com o tratamento prévio com a superóxido dismutase. Heim *et al.* (1991) observaram que o tratamento com L-NMMA aumentou as concentrações do ânion superóxido em artérias isoladas. Em concentrações superiores a 1 mM, o L-NMMA promoveu o relaxamento, estando o endotélio presente ou não, sendo esse efeito antagonizado com o subsequente tratamento com azul de metileno (Thomas e Ramwell, 1992). Frew *et al.* (1993) sugeriram uma habilidade seletiva do L-NMMA em bloquear a produção de NO basal, mas não a estimulada por agonista na aorta de rato. Assim, é possível que haja envolvimento de outras etapas no mecanismo de ação do L-NMMA em tecidos vasculares isolados.

O EBHA de *E. uniflora* não relaxou os anéis de aorta após a contração ter sido induzida pelo KCl (40, 60, 80 mM). Furchgott (1983) já havia observado que



quando as preparações eram contraídas previamente com líquido nutritivo despolarizante (80 mM KCl), ao invés de noradrenalina, a acetilcolina foi menos efetiva em promover o relaxamento em artérias pulmonares caninas. O aumento do potássio despolariza a membrana celular do músculo liso e abre canais de cálcio dependentes de voltagem, resultando em um influxo de cálcio extracelular e conseqüente contração (Godfraind e Kaba, 1972; Karaki *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1990). Os antagonistas de cálcio bloqueiam os canais do tipo L inibindo, assim, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo liso despolarizado (Godfraind e Govoni, 1995).

Goodfraind (1986) observou que a entrada de cálcio, responsável pela contração tônica do músculo liso ocorre através de canais de cálcio operados por voltagem e por receptor. A ativação de canais de cálcio, operados por receptor, induzida pela noradrenalina é sensível à presença de NO e ao conteúdo de GMPc; no entanto, a ativação de canais de cálcio operados por voltagem, induzida pela despolarização, é insensível a esses fatores.

Na artéria mesentérica perfundida de rato foi demonstrado que a resposta vasodilatadora à acetilcolina e à histamina resistente ao L-NAME era insensível à glibenclamida mas não à apamina, sugerindo isso que, na referida preparação, essas respostas são mediadas por canais de potássio ativados por cálcio (Adeagbo e Triggle, 1993). Esses mesmos autores, de acordo com os resultados obtidos,

propuseram que o FHDE liberado após a ativação de receptores muscarínicos  $M_3$  pode causar hiperpolarização no músculo liso vascular através de um canal de potássio sensível à apamina, enquanto o NO liberado como resultado da interação desse receptor pode causar vasodilatação através da ativação da guanilato ciclase solúvel. Quast (1993) referiu que o efeito vasodilatador de substâncias que promovem a abertura de canais de  $K^+$  é abolido na presença de elevadas concentrações de  $K^+$ . Da mesma forma, Adeagbo e Triggle (1993) observaram que na artéria mesentérica perfundida de rato a resposta vasodilatadora à acetilcolina e à histamina era parcialmente abolida quando estes vasos foram perfundidos previamente com KCl (60 mM). O efeito vasodilatador do EBHA de *E. uniflora* foi abolido quando a aorta com endotélio íntegro foi contraída previamente com elevadas concentrações de KCl. Apesar disso, o tetraetilamônio, a glibenclamida e a apamina não inibiram o efeito relaxante do EBHA na aorta de rato contraída previamente com noradrenalina. Como na aorta torácica de rato a resposta vasodilatadora ao EBHA de *E. uniflora* foi totalmente inibida pela L-NOARG e L-NAME, estes resultados sugerem que o NO poderia promover a abertura de um subtipo de canal de potássio que não foi afetado pelas drogas inibidoras utilizadas.

Os resultados sugerem que os compostos presentes nos extratos testados provocam o relaxamento através da via do NO da L-arginina ou através de substâncias que liberam o NO, as quais estão constitutivamente presentes na aorta

torácica de rato (Fitzpatrick *et al.*, 1995). Assim, os componentes ativos responsáveis por esse efeito aparentemente poderiam ser derivados das duas classes de compostos polifenólicos vegetais, os taninos e os flavonóides, que foram detectados no EBHA de *E. uniflora*, em estudos fitoquímicos preliminares e posteriormente caracterizados.

Como mecanismos alternativos aos efeitos vasodilatadores dos flavonóides sobre o músculo liso, podem ser sugeridos: uma interferência do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  transmembranário; uma inibição da atividade da fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico ou uma inibição da atividade de proteínas quinases (Duarte *et al.*, 1993a, b). Lanza *et al.* (1987) demonstraram que a quercetina bloqueou a agregação plaquetária através da inibição da fosfodiesterase cíclica, possivelmente poupando o AMPc. Husain *et al.* (1987) observaram que a miricetina e a quercetina apresentaram a maior atividade eliminadora de radicais hidroxila, dentre os vários flavonóides estudados, tendo sido sugerido que o efeito antioxidante dos flavonóides sobre a peroxidação lipídica poderia ser devido a sua propriedade eliminadora de radicais OH e  $\text{O}_2^-$  e ainda a sua capacidade de reagir com radicais peróxidos.

Os mecanismos através dos quais os componentes ativos do EBHA aumentam a produção do NO não estão totalmente esclarecidos. É possível que o EBHA de *E. uniflora* diminua a degradação de níveis basais de NO, talvez prevenindo a

destruição do NO pelo ânion superóxido (Gryglewski *et al.*, 1986). É conhecido que o radical livre superóxido pode interagir com ou inativar o NO (Gryglewski *et al.*, 1986). Robak e Gryglewski (1988) observaram que as propriedades antioxidantes da quercetina e da miricetina ocorrem principalmente através da eliminação de ânions superóxido. Esses dois flavonóides e a quercitrina foram identificados como constituintes das folhas de *E. uniflora* por Schmeda-Hirschmann *et al.* (1987), sendo que, no presente trabalho, foi identificada a presença da miricetina e da quercitrina.

Os taninos presentes no EBHA de *E. uniflora* também poderiam contribuir para o efeito relaxante encontrado. Russel e Rohrbach (1989) demonstraram que concentrações micromolares de taninos condensados relaxaram anéis da artéria pulmonar de cobaia, contraídos previamente com noradrenalina. Eles consideraram que estes taninos contribuíram para a liberação de fatores relaxantes da camada de células endoteliais, similares ao NO. É possível que níveis elevados de NO sejam resultado da diminuição do grau de inativação do NO ou da liberação de fatores relaxantes da camada celular endotelial ou de um bloqueio na quebra dos níveis basais de GMPc, por inibição de fosfodiesterases de nucleotídeo cíclico.

Houve uma diminuição significativa da resposta relaxante máxima da aorta torácica de rato à segunda curva cumulativa do EBHA de *E. uniflora*, administrado em intervalos de 30 min, 2 e 4 h após a primeira curva. Em outros experimentos com ratos anestesiados, foi observado que a segunda administração do EBHA

de *E. uniflora* também provocou uma dessensibilização na resposta hipotensora (Feltrin *et al.*, 1995). Esta acentuada taquifilaxia em relação à resposta vasorrelaxante poderia ocorrer através de uma ação inibitória exercida pelos taninos, constituintes químicos do EBHA de *E. uniflora*, sobre a atividade da NO-sintase endotelial constitutiva (eNOS), que é a enzima responsável pela produção fisiológica do fator relaxante do NO nos vasos sanguíneos. No entanto, a análise cinética da ação de um tipo de tanino comercial (Fluka) sobre a enzima não demonstrou efeito na ligação da L-arginina (Chiesi e Schwaller, 1995). Além disso, esse efeito inibitório do EBHA de *E. uniflora* não foi revertido por um excesso de L-arginina (1 mM) (dados não demonstrados) adicionada após a primeira curva relaxante. Assim sendo, parece haver uma diferença entre as classes mais comuns de inibidores que interferem com a ligação e utilização do substrato L-arginina. Entretanto, alterações na integridade geral das células podem também contribuir para a taquifilaxia induzida pelo tanino. Johnson *et al.* (1986) relataram alterações morfológicas pronunciadas em células endoteliais, quando expostas a taninos condensados por 30 min, sendo que os efeitos citotóxicos tornaram-se evidentes após 2 h de exposição.

Na quarta hora, após a primeira curva, houve uma recuperação parcial no efeito relaxante não indicando, provavelmente, uma alteração significativa nas células endoteliais. Com base nos experimentos realizados, não se pôde comprovar que o EBHA de *E. uniflora* tenha causado lesão no endotélio, uma vez que ocorreu

inibição da resposta máxima contrátil da aorta de rato com endotélio íntegro à noradrenalina ( $CI_{50}$  58 (53-63)  $\mu\text{g/mL}$ ). A remoção do endotélio aumenta a resposta contrátil da musculatura lisa vascular aos agonistas dos  $\alpha$ -adrenoceptores (Furchgott, 1984). O endotélio vascular está envolvido com o efeito relaxante de vários agonistas através do aumento de GMPc via NO, podendo ainda ser considerado como modulador do efeito contrátil de vários agonistas (Rapoport e Murad, 1983; Burton *et al.*, 1990). Fitzpatrick *et al.* (1993) observaram que, quando produtos extraídos de uvas eram previamente incubados nas preparações, ocorria uma inibição da resposta máxima a agonistas de receptores alfa na aorta de rato com endotélio íntegro.

Por outro lado, a segunda curva obtida da fração aquosa do EBHA de *E. uniflora*, onde se encontram os taninos gálicos e elágicos, apresentou  $67,76 \pm 4,06\%$  de relaxamento em relação à resposta contrátil à noradrenalina. De acordo com estes resultados, os referidos poliésteres encontrados nas folhas de *E. uniflora* não podem ser considerados responsáveis por esta taquifilaxia. Já as concentrações crescentes da fração acetato de etila, onde se encontram os flavonóides quercitrina e miricetina, apresentaram  $44,05 \pm 2,78\%$  de relaxamento nos anéis de aorta de rato com endotélio. Desta forma, a atividade taquifilática do EBHA de *E. uniflora* provavelmente ficou retida, em parte, na fração diclorometano. Os resultados do

presente trabalho não estão de acordo com os de Chiesi e Schwaller (1995), mas sim com os de Russel e Rohrbach (1989) e Fitzpatrick *et al.* (1993).

Russel e Rohrbach (1989) verificaram que taninos condensados relaxaram a artéria pulmonar de coelho com endotélio, contraída previamente com noradrenalina. Fitzpatrick *et al.* (1993) observaram que, dos vários extratos testados, preparados à base de uvas, o de frutas escuras foi o mais potente em induzir o relaxamento da aorta de rato dependente de endotélio previamente contraída com fenilefrina. Dos constituintes químicos destas frutas, o ácido tânico e a quercetina também apresentaram efeito vasorrelaxante nesta preparação biológica. Os extratos brutos das uvas também aumentaram os níveis de GMPc no tecido vascular e, tanto o efeito relaxante quanto o aumento de GMPc, foram bloqueados por inibidores competitivos da síntese de NO.

Os taninos gálicos e elágicos encontrados na fração aquosa do EBHA de *E. uniflora* apresentaram a mesma atividade vasorrelaxante do ácido tânico (Fitzpatrick *et al.*, 1993) e dos taninos condensados (Russel e Rohrbach, 1989); porém, não foi possível classificar o tanino de origem comercial (procedente da Fluka, Suíça) utilizado por Chiesi e Schwaller (1995).

Diversos motivos prejudicaram a interpretação dos resultados de polifenóis: alguns trabalhos que estudaram a atividade biológica deste grupo de substâncias não especificaram o tipo de tanino. Além disso, estes poliésteres têm várias ações

bioquímicas, tais como: inibição da enzima  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático do músculo esquelético; estimulação da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático cardíaco (Shoshan e Mac Lennan, 1981; Chiesi e Schwaller, 1994); inibição da  $\text{Na/K}^{+}$ -ATPase (Mirsalikhova e Pakudina, 1977) e de fosfodiesterases (Beretz *et al.*, 1978).

Vários extratos de plantas e muitos constituintes encontrados em vários alimentos que causam vasorrelaxamento endotélio dependente, *in vitro*, são mediados pelo NO, aumentando os níveis de GMPc. Muitos trabalhos têm demonstrado que uma via NO-GMPc defeituosa ocorre em doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, problemas arteriais coronarianos (Förstermann *et al.* 1988; Cooke *et al.* 1991) e hipertensão (Panza *et al.* 1990). Uma produção de NO adequada, ou mesmo aumentada, pode ser benéfica em algumas situações patológicas, propiciando vasodilatação, antiagregação plaquetária (Gryglewski *et al.* 1987) e inibição da oxidação do LDL (Frankel *et al.* 1993; Myara *et al.* 1993). Desta forma, uma dietoterapia adequada e um tratamento fitoterápico poderiam auxiliar no tratamento de doenças cardiovasculares.



## RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho avaliou a atividade hipoglicemiante do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *Eugenia uniflora* L. (EBHA de *E. uniflora*), *in vivo*, em ratos normais e diabéticos (induzidos por estreptozotocina) e investigou os possíveis mecanismos envolvidos no relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* e suas frações, *in vitro*, na aorta torácica isolada de rato. Além disso, foram realizados experimentos com musculaturas lisas não vasculares: íleo isolado de cobaia, útero isolado de rata e ducto deferente isolado de rato.

Para a obtenção do EBHA de *E. uniflora*, as folhas secas e moídas foram maceradas em uma mistura hidroetanólica. Este extrato foi suspenso em água destilada e submetido à partição com diclorometano e acetato de etila.

No EBHA de *E. uniflora* foi detectada a presença de polifenóis, taninos e flavonóides; na fração diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), a presença de esteróis e/ou triterpenos; na fração acetato de etila ( $\text{AcOEt}$ ), compostos polifenólicos e flavonóides e na fase aquosa, taninos. Da fração  $\text{AcOEt}$ , foram isolados e identificados os flavonóides miricetina, como aglicona e sob a forma de ramnosídeo, o heterosídeo quercitrina (ramnosídeo da quercetina) e o ácido gálico.

Os experimentos biológicos desenvolvidos com o EBHA de *E. uniflora* e suas frações demonstraram que:

1. O EBHA de *E. uniflora* não pode ser considerado antidiabetogênico, quando administrado em doses repetidas. Neste experimento, os animais tratados com o EBHA de *E. uniflora*, tanto normais quanto diabéticos, apresentaram um menor ganho de peso em relação aos seus respectivos controles, resultado esse que poderia estar relacionado com a presença de constituintes químicos que diminuem a absorção de nutrientes, como por exemplo, os taninos.

2. A incubação prévia de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* inibiu, de forma não competitiva e concentração dependente, as contrações máximas ( $CI_{50}$  -95% limite de confiança,  $\mu\text{g/mL}$ ) da acetilcolina (ACh) 130 (80-190) e da histamina 110 (100-130), no íleo isolado de cobaia; da ACh 190 (130-290), e da ocitocina 150 (130-170) no útero isolado de rata; da noradrenalina no ducto deferente isolado de rato 390 (300-500) e na aorta torácica isolada de rato 58 (53-63). No entanto, a sensibilidade ( $CE_{50}$  -95% limite de confiança) foi alterada significativamente à ACh no íleo isolado de cobaia de 0,07 (0,03-0,15)  $\mu\text{M}$  para 11 (0,66-1,83)  $\mu\text{M}$  e para 229 (104-505)  $\mu\text{M}$ , respectivamente, na concentração de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de EBHA de *E. uniflora*. A  $CE_{50}$  da histamina foi aumentada de 0,49 (0,27-0,88) nM para 1,96 (1,28-3,01) nM.

3. A adição de concentrações crescentes e cumulativas do EBHA de *E. uniflora* causou uma resposta relaxante concentração-dependente nos anéis de

aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, contraídos previamente com noradrenalina (30-100 nM). O valor da  $CI_{50}$  com seu respectivo limite de confiança e o relaxamento máximo ( $R_{max}$ ) foram de 7,02 (4,77-10,00)  $\mu\text{g/mL}$  e  $83,94 \pm 3,04\%$ , respectivamente. A remoção do endotélio reduziu o relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* para  $6,19 \pm 3,30\%$ .

4. Após a primeira curva de relaxamento do EBHA de *E. uniflora*, foram repetidas novas curvas em 30 min, 2 e 4 horas de intervalo da primeira curva. A média de relaxamento foi de  $25,59 \pm 3,41\%$  após 30 min, de  $17,75 \pm 2,77\%$  após 2 horas, e, de  $48,46 \pm 9,50\%$  decorridas 4 horas. As frações aquosa e de AcOEt apresentaram um relaxamento máximo de  $91,76 \pm 2,44\%$  e  $83,29 \pm 8,79\%$ , respectivamente. Decorridos 30 min após a primeira curva de relaxamento, o  $R_{max}$  da fração aquosa foi de  $67,76 \pm 4,06\%$  e o da fração de AcOEt de  $44,05 \pm 2,78\%$ . Isto sugeriu um efeito taquifilático por parte da última e também do EBHA de *E. uniflora*. Não foi possível comprovar que o EBHA de *E. uniflora* causasse lesão no endotélio, uma vez que a incubação prévia de concentrações crescentes do EBHA de *E. uniflora* ( $CI_{50}$  58 (53-63)  $\mu\text{g/mL}$ ) diminuiu a contração máxima das curvas concentração-resposta à noradrenalina.

5. Para verificar um provável papel da via do óxido nítrico sobre o efeito relaxante do EBHA de *E. uniflora*, na aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro, curvas concentração-relaxamento deste extrato foram feitas na presença de

vários inibidores da óxido nítrico sintase, como N<sup>W</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), N<sup>W</sup> nitro metil éster L-Arginina (L-NAME) e N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), sendo demonstrado que:

5.1. L-NOARG (30  $\mu$ M), inibiu o relaxamento da aorta induzido pelo EBHA de *E. uniflora* ( $R_{\max}$  -10,43  $\pm$  7,81%) e a adição do substrato endógeno L-arginina (1mM), da via do NO, reverteu totalmente o efeito inibitório da L-NOARG ( $R_{\max}$  78,78  $\pm$  6,53%), não ocorrendo o mesmo com a adição de D-arginina (1 mM) ( $R_{\max}$  5,10  $\pm$  2,39%).

5.2. L-NAME (30  $\mu$ M) também bloqueou o relaxamento da aorta induzido pelo EBHA de *E. uniflora* ( $R_{\max}$  -3,69  $\pm$  2,62%), não sendo este efeito, no entanto, revertido com o tratamento prévio com a L-arginina (1 e 10 mM).

5.3. L-NMMA (300  $\mu$ M), não apresentou efeito nem sobre o relaxamento da aorta induzido pelo EBHA de *E. uniflora*, nem sobre o provocado pela acetilcolina.

6. O azul de metileno, inibidor da guanilato ciclase solúvel, na concentração de 10  $\mu$ M, não afetou a curva relaxante do EBHA de *E. uniflora*, porém, na concentração de 30  $\mu$ M ( $R_{\max}$  14,60  $\pm$  7,40%), bloqueou o relaxamento induzido pelo EBHA de *E. uniflora* na aorta torácica isolada de rato.

7. A incubação prévia com a apamina (0,3  $\mu$ M), glibenclamida (3  $\mu$ M), tetraetilamônio (30  $\mu$ M), pirilamina (1  $\mu$ M), propranolol (1  $\mu$ M), indometacina (1 e 10  $\mu$ M) e atropina (1  $\mu$ M) não apresentou efeito significativo no relaxamento

induzido pelo EBHA de *E. uniflora* em anéis de aorta torácica isolada de rato com endotélio íntegro.

8. O EBHA de *E. uniflora* não relaxou os anéis de aorta torácica de rato com endotélio íntegro, contraídos previamente com potássio (40, 60, 80 mM) e nem o útero de rata previamente contraído com ocitocina (30 mUI/mL).

Os resultados obtidos permitiram concluir que o relaxamento provocado pelo EBHA de *E. uniflora* e suas frações é dependente da integridade do endotélio e sugerem o envolvimento da via do óxido nítrico na aorta torácica isolada de rato. Na musculatura lisa não vascular, o EBHA de *E. uniflora* apresentou um perfil de antagonismo não-competitivo, porém, no íleo isolado de cobaia o EBHA de *E. uniflora* diminuiu a sensibilidade à acetilcolina e à histamina.

São necessários estudos farmacológicos e bioquímicos posteriores para elucidar a potência e os mecanismos de ação das diferentes frações e das suas principais substâncias e, assim, ser possível demonstrar, com maior clareza, a atividade específica dos diferentes constituintes fitoquímicos de *E. uniflora*, tanto na aorta torácica isolada de rato, como também em outros ensaios biológicos.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study evaluated the hypoglycemic effect of the crude hydroethanolic extract of the *Eugenia uniflora* L. (*E. uniflora* EBHA) *in vivo*, in normal and streptozotocin-induced diabetic rats, as well as investigated the mechanisms likely involved in the EBHA-induced relaxation of *E. uniflora*, and their fractions, *in vitro*, in the rat isolated thoracic aorta. Moreover, experiments in non-vascular smooth muscles: guinea-pig isolated ileum, rat isolated uterus and rat isolated vas deferens were carried out.

In order to obtain the *E. uniflora* EBHA, the dried powered leaves were submitted to maceration in an hydroethanolic mixture. This extract was suspended in distilled water and submitted to partition with dicloromethane and ethyl acetate.

Polyphenols, tannins and flavonoids were found in the *E. uniflora* EBHA; steroids and/or triterpenes were found in the dicloromethane fraction; polyphenolic compounds and flavonoids were found in the ethyl acetate fraction and tannins in the aqueous phase. Flavonoids myricetin (the aglycone and the rhamnoside), quercitrin (quecetin-rhamnoside) and galic acid were isolated and identified in AcOEt fraction.

The biological experiments developed with the *E. uniflora* EBHA and its fractions revealed that:

1. The results obtained revealed that *E. uniflora* EBHA is not reported to have antidiabetic properties when administered in repeated doses. In this experiment, the

rats treated with the *E. uniflora* EBHA-the normal as well as the diabetic ones, presented lower weight gains in relation to their controls. Such results may be related to the presence of chemical constituents that avoid the absorption of nutrients, e.g., tannins in the extract.

2. The preincubation of increasing concentrations of the *E. uniflora* EBHA inhibited dependent-concentration and non competitive way, the maximum concentrations ( $IC_{50}$ -95% confidence limit,  $\mu\text{g/mL}$ ) of acetylcholine (ACh) 130 (80-190), histamine 110 (100-130) in the guinea-pig isolated ileum; ACh 190 (130-290), and oxytocin 150 (130-170) in the rat isolated uterus; noradrenaline in the rat isolated vas deferens 390 (300-500) and in the rat isolated thoracic aorta 58 (53-63). Nevertheless, the sensitivity ( $EC_{50}$ -95% of confidence limit) was altered significantly at ACh in the guinea-pig isolated ileum of 0.07 (0.03-0.15)  $\mu\text{M}$  to 11 (0.66-1.83)  $\mu\text{M}$  and to 229 (104-505)  $\mu\text{M}$ , respectively in the concentration of 100-200  $\mu\text{g/mL}$  of the *E. uniflora* EBHA. The  $EC_{50}$  of histamine was raised from 0.49 (0.27-0.88) nM to 1.96 (1.28-3.01) nM.

3. The addition of increasing cumulative concentration of *E. uniflora* EBHA caused a relaxation dose-dependent response in the intact endothelium-thoracic aorta rings, precontracted with noradrenaline (30-100 nM). The value of  $IC_{50}$  with its respective confidence limit and the maximum relaxation ( $R_{\text{max}}$ ) was

7.02 (4.77-10.00)  $\mu\text{g/mL}$  and  $83.94 \pm 3.04\%$ , respectively. The removal of the endothelium reduced the *E. uniflora* EBHA-induced relaxation to  $6.19 \pm 3.30\%$ .

4. After the first *E. uniflora* EBHA relaxation curve, new curves were obtained at intervals of 30 min, 2 and 4 hours from the first curve. The mean of relaxation was  $25.59 \pm 3.41\%$  after 30 min,  $17.25 \pm 2.77\%$  after 2 h and  $48.46 \pm 9.50\%$  after 4 h. The ethyl acetate and aqueous fractions presented a maximum relaxation of  $91.76 \pm 2.44\%$  and  $83.29 \pm 8.79\%$ , respectively; 30 min after the first relaxation curve, the  $R_{\text{max}}$  of the aqueous fraction was  $67.76 \pm 4.06\%$  and the ethyl acetate fraction was  $44.05 \pm 2.78\%$ . This suggests a tachyphylatic effect induced by *E. uniflora* EBHA and its ethyl acetate fraction. The study was unable to supply pharmacological proof that the *E. uniflora* EBHA caused any lesion to the endothelium, since the preincubation with increasing concentrations of EBHA ( $\text{IC}_{50}$  58 (53-63)  $\mu\text{g/mL}$ ) decreased the maximal contractions from the curve-dose response to noradrenaline.

5. In order to observe a likely action of the nitric oxide pathway on the relaxation effect of the *E. uniflora* EBHA in the rat isolated thoracic aorta, with intact endothelium, relaxation-dose curves of this extract were produced in the presence of various nitric oxide synthase inhibitors, as  $\text{N}^{\text{W}}$ -nitro-L-arginine (L-NOARG),  $\text{N}^{\text{W}}$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) and  $\text{N}^{\text{G}}$ -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) showing that:



5.1. L-NOARG (30  $\mu$ M), inhibited the *E. uniflora* EBHA induced-aorta relaxation ( $R_{\max}$   $-10.43 \pm 7.81\%$ ), and the addition of the L-arginine (1mM) endogenous substrate of the NO pathway, totally reverted the inhibitory effect of L-NOARG ( $R_{\max}$   $78.78 \pm 6.53\%$ ), however the same did not occur with addition of D-arginine (1mM) ( $R_{\max}$   $5.10 \pm 2.39\%$ ).

5.2. L-NAME (30  $\mu$ M) also blocked the *E. uniflora* EBHA-induced aorta relaxation ( $R_{\max}$   $-3.69 \pm 2.62\%$ ); nevertheless, this effect was not reverted with L-arginine (1 and 10 mM) pretreatment.

5.3. L-NMMA (300  $\mu$ M) did not show any effect either on the *E. uniflora* EBHA-induced aorta relaxation or on the acetylcholine-induced one.

6. The methylene blue, a soluble guanylate cyclase inhibitor, at 10  $\mu$ M concentration did not affect the *E. uniflora* EBHA relaxant curve; however, at 30  $\mu$ M ( $R_{\max}$   $14.60 \pm 7.40\%$ ), it blocked the *E. uniflora* EBHA-induced relaxation of the rat isolated thoracic aorta.

7. The preincubation with apamin (0.3  $\mu$ M), glybenclamide (3  $\mu$ M), tetraethylammonium (30  $\mu$ M), pyrilamine (1  $\mu$ M), propranolol (1  $\mu$ M), indomethacin (1 and 10  $\mu$ M) and atropine (1  $\mu$ M) did not present significant effect on the *E. uniflora* EBHA-induced relaxation in rings of the rat isolated thoracic aorta with intact endothelium.

8. The *E. uniflora* EBHA did not relax the rings of the rat thoracic aorta with intact endothelium, precontracted with potassium (40, 60, 80 mM) and neither relaxed the rat uterus precontracted with oxytocin (30 mUI/mL).

The obtained results led us to conclude that the *E. uniflora* EBHA-induced relaxation and its fractions are dependent upon the integrity of the endothelium and suggest the involvement of the nitric oxide pathway in the rat isolated thoracic aorta. In the non-vascular smooth muscle, the *E. uniflora* EBHA presented a profile of non-competitive antagonism; however, in the guinea-pig isolated ileum, the *E. uniflora* EBHA decreased the sensitivity to acetylcholine and to histamine.

Further biochemical and pharmacological studies are necessary in order to elucidate the action mechanisms and potency of different fractions and their main substances, thus allowing for a more clear demonstration of the specific activity of the different phytochemical constituents of the *E. uniflora*, both in the rat isolated thoracic aorta and in other biological assays.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEAGBO, A.S.O.; TRIGGLE, C.R. Varying extracellular  $[K^+]$ : A functional approach to separating EDHF- and EDNO-related mechanisms in perfused rat mesenteric arterial bed. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 21: 423-429, 1993.
- ADEBAJO, A.C.; OLOKE, K.J.; ALADESANMI, A.J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia*, 60: 451-455, 1989.
- AFANAS'EV, I.G.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, 38: 1763-1769, 1989.
- AKERELE, O. WHO's traditional medicine program progress and perspectives. *Who chronid*, 38: 76-81, 1984.
- ALICE, C.B.; VARGAS, V.M.F.; SILVA, G.A.A.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; SCHAPOVAL, E.E.S.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J.A.P.; HENRIQUES, A.T. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 35: 165-171, 1991.
- AOKI, E.; TAKEUCHI, I.K.; SHOJI, R. Nitric oxide: an attractive signaling molecule. *Acta Histochem. Cytochem.*, 28: 97-106, 1995.
- ARCHER, S.L.; HAMPL, V.  $N^G$ -monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in *paradise*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188: 590-596, 1992.
- ARDUÍNO, F. *Diabetes Mellitus*. 3. ed., Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 1980.
- BASSENGE, E. Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 34: 37s-42s, 1992.
- BEILIN, L.J.; CHU, Z.M. Nitric oxide-dependent and -independent mechanisms of vasodilation in pregnancy. *J. Hypert.* 11 (Suppl. 5): S148-S149, 1993.

- BENNETT, B.M.; McDONALD, B.J.; NIGAM, R.; SIMON, W.C. Biotransformation of organic nitrates and vascular smooth muscle cell function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 245-249, 1994.
- BENZING, T.; WINTER, I.; BUSSE, R. Feedback inhibition by NO of the  $\text{Ca}^{2+}$  dependent autacoid formation in human endothelial cells is mediated by cyclic GMP. *Pflügers Arch.*, 420 (suppl. 1): 467, 1992.
- BERETZ, A.; ANTON, R.; STOCLET, J.C. Flavonoid compounds are potent inhibitors of cAMP phosphodiesterase. *Experientia*, 34: 1054, 1978.
- BERTUGLIA, S.; MALANDRINO, S.; COLANTUONI, A. Effects of the natural flavonoid delphinidin on diabetic microangiopathy. *Drug Res.*, 45: 481-485, 1995.
- BILLIAR, T.R. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Annals Surg.*, 221: 339-349, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Programas Especiais de Saúde. *Manual de Diabetes*. Brasília, 1993.
- BREDT, D.S.; FERRIS, C.D.; SNYDER, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. *J. Biol. Chem.*, 267: 10976-10981, 1992.
- BRÜNE, B.; LAPETINA, E.G. Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181: 921-926, 1991.
- BURNS, F.; STEVENS, P.A.; PYNE, N.J. The identification of apparently novel cyclic AMP cyclic GMP phosphodiesterase activities in guinea-pig tracheal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 113: 3-4, 1994.
- BURTON, G.A.; MacNEIL, S.; DE JONGE, A.; HAYLOR, J. Cyclic GMP release and vasodilatation induced by EDRF and atrial natriuretic factor in the isolated perfused kidney of the rat. *Br. J. Pharmacol.*, 99: 364-368, 1990.
- BUSSE, R.; FLEMING, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Annals Med.*, 27: 331-340, 1995.
- BUTLER, L.G.; ROGLER, J.C. Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. In: HO, C.-T.; LEE, C.Y.; HUANG, M.-T. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I. Analysis, Occurrence, and Chemistry*. Washington : American Chemical Society, 1992.

- CALVER, A.; COLLIER, J.; VALLANCE, P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Experim. Physiol.*, 78: 303-326, 1993.
- CHACRA, A.R. Etiopatogenia do diabetes mellitus. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 32: 187-190, 1988.
- CHEN, P.Y.; ST-JOHN, P.L.; KIRK, K.A.; ABRAHAMSON, D.R.; SANDERS, P.W. Hypertensive nephrosclerosis in the Dahl/Rapp rat. Initial sites of injury and effect of dietary L-arginine supplementation. *Lab. Invest.*, 68: 174-184, 1993.
- CHESTER, A.H.; O'NEIL, G.S.; MONCADA, S.; TADJKARIMI, S.; YACOUB, M.H. Low basal and stimulated release of nitric oxide in the atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Lancet*, 336: 897-900, 1990.
- CHIESI, M.; SCHWALLER, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem. Pharmacol.*, 49: 495-501, 1995.
- CHIESI, M.; SCHWALLER, S. Reversal of phospholambam-induced inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by tannin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 202: 1688-1673, 1994.
- CLOUTIER, M.M.; GUERNSEY, L. Tannin inhibition of protein kinase C in airway epithelium. *Lung*, 173: 307-319, 1995a.
- CLOUTIER, M.M.; GUERNSEY, L. Tannin inhibits adenylate cyclase in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 268: L851-L855, 1995b.
- COHEN, R.A. Dysfunction of vascular endothelium in diabetes mellitus. *Circulation*, 87: V-67-V-76, 1993.
- COOKE, J.P.; ANDON, N.A.; GIRERD, X.J.; HIRSCH, A.T.; CREAGER, M.A. Arginine restores cholinergic relaxation of hypercholesterolemic rabbit thoracic aorta. *Circulation*, 83: 1057-1062, 1991.
- CORRÊA, D.S.; RABETTI, A.C.; RAE, G.A. ATP-sensitive potassium channels do not mediate vasorelaxation by acetylcholine or iloprost. *Braz. J. Med. Res.*, 24: 729-734, 1991.
- CROCKER, C.L. Rapid determination of urea nitrogen in serum or plasma without deproteinization. *Am. J. Med. Technol.*, 23: 361-365, 1967.

- DAVADA, R.K.; CHANDLER, L.J.; GUZMAN, N.J. Protein kinase C modulates receptor-independent activation of endothelial nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.*, 266: 237-244, 1994.
- DAVENPORT, A.P.; MAGUIRE, J.J. Is endothelium-induced vasoconstriction mediated only by ET<sub>A</sub> receptor in humans? *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 9-11, 1994.
- DE MEY, J.G.; VANHOUTE, P.M. Heterogenous behavior of the canine arterial and venous wall. *Circ. Res.*, 51: 439-477, 1982.
- DREXLER, H.; ZEHER, A.M.; MEINZER, K.; JUST, H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet*, 338: 1545-1550, 1991.
- DOHI, Y.; THIEL, M.A.; BUHLER, F.R.; LUSCHER, T.F. Activation of endothelial L-arginine pathway in resistance arteries. *Hypertension*, 15: 170-179, 1990.
- DOMINGUEZ, X. A. *Metodos de Investigación Fitoquímica*. México: Limusa, 1973.
- DOUGLAS, S.; MEEK, T.; OHLSTEIN, E. Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 313-316, 1994.
- DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; UTRILLA, P.; JIMINEZ, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle: structure-activity relationships. *Gen. Pharmacol.*, 24: 857-862, 1993a.
- DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; UTRILLA, P.; JIMINEZ, J.; TAMARGO, J.; ZARZUELO, A. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 239: 1-7, 1993b.
- DUMONT, E.; LAMONTAGNE, D. NO role of ATP-sensitive potassium channels in the vasoconstriction produced by vasopressin. *J. Vasc. Res.*, 32: 138-142, 1995.
- ECKLY, A.; LUGNIER, C. Role of phosphodiesterases III e IV in the modulation of vascular cyclic AMP content by the NO/cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 113: 445-450, 1994.

- EIZIRIK D.; LEIJERSTAM F. The inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) in insulin-producing cells. *Diabete Metab.*, 20: 116-122, 1994.
- FELETOU, M.; VANHOUTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 93: 515-524, 1988.
- FELTRIN, M.; WAZLAWIK, E.; PETERS, R.R.; SILVA, M.A. da; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; NICOLAU, M. Avaliação da dessensibilização à resposta hipotensora induzida pelo extrato bruto hidroalcoólico da folha de *Eugenia uniflora* L. Mirtaceae (pitanga). *X Reunião Anual da FESBE*. Caxambu, MG, 1995.
- FERNANDES, P.D.; ASSREUY, J. Oxído nítrico e sistema cardiovascular. *Ciência Hoje*, 18: 8-10, 1994.
- FERRO, E.; SCHININI, A.; MALDONADO, M.; ROSNER, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. *Eugenia uniflora* leaf extract and lipid metabolism in *Cebus pella* monkeys. *J. Ethnopharmacol.*, 24: 321-325, 1988.
- FISCHER, L.J.; HAMBURGUER, S. Inhibition of insulin secretion from isolated pancreatic islets treated with dihydroxyfumarate. *Fed. Proc.*, 38: 528, 1979.
- FISCUS, R.R. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. In: *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* - Supplement. New York : Thieme, 1988.
- FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; RICCI, T.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 26: 90-95, 1995.
- FITZPATRICK, D.F.; HIRSCHFIELD, S.L.; COFFEY, R.G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am. J. Physiol.*, 265: H774-H778, 1993.
- FLAVAHAN, N.A. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Circulation*, 85: 1927-1938, 1992.
- FLEMING, W.W.; WESTPHALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S.; JELLET, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 181: 339-345, 1972.

- FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.*, 33: 1061-1080, 1995.
- FÖRSTERMANN, U. Biochemistry and molecular biology of nitric oxide synthases. *Arzneimittelfors-Chung*, 44: 402-407, 1994.
- FÖRSTERMANN, U.; MÜGGE, A.; ALHEID, U.; HAVERICH, A.; FRÖLICH, J.C. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ. Res.*, 62: 185-190, 1988.
- FRANKEL, E.N.; KANNER, J.; GERMAN, J.B.; PARKS, E.; KINSELLA, J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, 341: 454-457, 1993.
- FREW, J.D.; PAISLEY, K.; MARTNI, W. Selective inhibition of basal but not agonist-stimulated activity of nitric oxide in rat aorta by N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 1003-1008, 1993.
- FUKUTO, J.M.; CHADHURI, G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 195-211, 1995.
- FURCHGOTT, R.F. The role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, 53: 557-573, 1983.
- FURCHGOTT, R.F. The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24: 175-197, 1984.
- FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTE, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.*, 3: 2007-2018, 1989.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-376, 1980.
- GALLE, J.; MÜLSCH, A.; BUSSE, R.; BASSENGE, E. Effects of native and oxidized low density lipoproteins on formation and inactivation of endothelium-derived relaxing factor. *Arterioscl. Thromb.*, 11: 198-203, 1991.



- GARG, U.C.; HASSID, A. Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in Balb/c 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 266: 9-12, 1991.
- GARLAND, C.J.; PLANE, F.; KEMP, B.K.; COCKS, T.M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *TIPS*, 16: 23-30, 1995.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurol. Sci.*, 14: 60-67, 1991.
- GIBALDI, M. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J. Clin. Pharmacol.*, 33: 488-496, 1993.
- GIRERD, X.J.; HIRSCH, A.T.; COOKE, J.P.; DZAU, V.J.; CREAGER, M.A. L-arginine endothelium-dependent vasodilation in cholesterol fed rabbits. *Circ. Res.*, 67: 1301-1308, 1990.
- GODFRAIND, T. EDRF and cyclic GMP control gating of receptor-operated calcium channels in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 126: 341-343, 1986.
- GODFRAIND, T.; GOVONI, S. Recent advances in the pharmacology of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{K}^{+}$  channels. *Trends Pharmacol. Sci.*, 16: 1-4, 1995.
- GODFRAIND, T.; KABA, A. The role of calcium in the action of drugs on vascular smooth muscle. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 196: 36-49, 1972.
- GRANKVIST, K.; MAKLUND, S.; TALJEDAL, I.B. Superoxide dismutase is prophylactic against alloxan diabetes. *Nature*, 294: 158-160, 1981.
- GROSS, S.S.; WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.*, 57: 37-69, 1995.
- GRYGLEWSKI, R.J. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol. Toxicol.*, 77: 1-9, 1995a.
- GRYGLEWSKI, R.J. Interactions between endothelial secretagogues. *Annals of Medicine*, 27: 421-427, 1995b.
- GRYGLEWSKI, R.J. Interactions between nitric oxide and protacyclin. *Semin. Thromb. Hemost.*, 19: 158-166, 1993.

- GRYGLEWSKI, R.J.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, 36: 317-322, 1987.
- GRYGLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320: 454-456, 1986.
- GUNNARSSON, R.; BERNE, C.; HELLERSTROM, C. Cytotoxic effects of streptozotocin and N-nitro-methylurea on the pancreatic  $\beta$  cells with special regard to the role of nicotinamide-adenosine dinucleotide. *Biochemistry*, 140: 487-494, 1974.
- HAGERMAN, A.E. Tannin-protein interactions. In: HO, C.-T.; LEE, C.Y.; HUANG, M.-T. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I. Analysis, Occurrence, and Chemistry*. Washington: American Chemical Society, 1992.
- HAMPL, V.; HUANG, J.M.; WEIR, E.K.; ARCHER, S.L. Activation of the cGMP-dependent protein kinase mimics the stimulatory effect of nitric oxide and cGMP on calcium-gated potassium channels. *Physiol. Res.*, 44: 39-44, 1995.
- HARRISON, D.G. Alterations of vasomotor regulation in atherosclerosis. *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 9: 55-63, 1995.
- HASLAM, E. *Plant Polyphenols. Vegetables Tannins Revised*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.
- HAWK, P.B.; OSER, B.L.; SUMMERSON, W.H. *Practical physiological chemistry*. 12. Ed., New York : Blakiston Co, 1947.
- HECKER, M.; LÜCKHOFF, A.; BUSSE, R. Modulation of endothelial autacoid release by protein kinase C: feedback inhibition or non-specific attenuation of receptor-dependent cell activation. *J. Cell. Physiol.*, 156: 571-578, 1993.
- HEIM, K.F.; THOMAS, G.; RAMWELL, P.W. Effect of substituted arginine compounds on superoxide formation in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 257: 1130-1135, 1991.
- HENRIQUES, A.T.; SOBRAL, M.E.; CAUDURO, A.D.; SCHAPOVAL, E.E.S.; BASSANI, V.L. Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 5: 501-505, 1993.

- HERMANN, K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 186: 1-5, 1988.
- HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342: 1007-1011, 1993.
- HOLZMANN, S. Endothelium-induced relaxation by acetylcholine associated with larger rises in cyclic GMP in coronary arterial strips. *J. Cyclic Nucl. Res.*, 8: 409-419, 1982.
- HUANG, J.; ROBY, K.F.; PACE, J.L.; RUSSELL, S.W.; HUNT, J.S. Cellular localization and hormonal regulation of inducible nitric oxide synthase in cycling mouse uterus. *J. Leukoc. Biol.*, 57: 27-35, 1995.
- HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26: 2489-2491, 1987.
- IGNARRO, J.L.; DEGNAN, J.N.; BARICOS, W.H.; KADOWITZ, P.J.; WOLIN, M.S. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme: comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochem. Biophys. Acta*, 718: 49-59, 1982.
- IGNARRO, L.J.; BURKE, T.M.; WOOD, K.S.; WOLIN, M.S.; KADOWITZ, P.J. Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J. Pharm. Exper. Ther.*, 228: 682-690, 1984.
- IGNARRO, L.J. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*. 16: 477-483, 1990.
- INOUE, M.; OKAMURA, T.; TODA, N. Influence of methylene blue and oxyhemoglobin on mammalian vascular responses to sodium nitroprusside and nitroglycerin. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 311: 104-121, 1991.
- INOUE, T.; FUKUO, K.; NAKAHASHI, T.; HATA, S.; MORIMOTO, S.; OGIHARA, T. cGMP upregulates nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 25: 711-714, 1995.

- INOUE, Y.; SHIMAMURA, K.; SPERELAKIS, N. OT actions on voltage-dependent ionic channels in pregnant rat uterine smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 70: 1597-1603, 1992.
- JOHNSON, C.M.; HANSON, M.N.; ROHRBACH, M.S. Toxicity of endothelial cells mediated by cotton bract tannin. *Am. J. Pathol.*, 122: 399-409, 1986.
- KAISER, L.; SPICKARD, R.C.; OLIVIER, N.B. Heart failure depresses endothelium-dependent responses in canine femoral artery. *Am. J. Physiol.*, 256: H962-H967, 1989.
- KARAKI, H.; URAKAWA, N.; KUTSKY, P. Potassium-induced contraction in smooth muscle. *Japan. J. Smooth Mus. Res.*, 20: 427-444, 1984.
- KATUSIC, Z.S.; SCHUGEL, J.; COSENTINO, F.; VANHOUTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to oxygen-derived free radicals in the canine basilar artery. *Am. J. Physiol.*, 264: H859-H864, 1993.
- KERWIN Jr., J.F.; LANCASTER Jr., J.R.; FELDMAN, P.L. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.*, 38: 4333-4362, 1995.
- KERWIN, J.F.; HELLER, M. The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. *Med. Res. Rev.*, 24: 23-74, 1994.
- KIHARA, M.; LOW, P.A. Impaired vasoreactivity to nitric oxide in experimental diabetic neuropathy. *Exper. Neurol.*, 132: 180-185, 1995.
- KIECHLE, F.L.; MALINSKI, T. Nitric oxide. Biochemistry, pathophysiology and detection. *Am. J. Clin. Pathol.*, 100: 567-575, 1993.
- KIM, C.D.; LEEM W.S.; RHIM, B.Y.; HONG, K.W. Similarities between effects of superoxide-mediated endothelium-derived relaxing factor and cromakalim. *Am. J. Physiol.*, 262: H1468-H1473, 1992.
- KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, 298: 249-258, 1994.
- KOMORI, K.; SUZUKI, H. Electrical responses of smooth muscle cells during cholinergic vasodilation in the rabbit saphenous artery. *Circ. Res.*, 61: 586-593, 1987.

- KOSTKA, P. Free radicals (nitric oxide). *Anal. Chem.*, 67: 411R-416R, 1995.
- KU, D.D.; LIU, S.; BECKMAN, J.S. Peroxynitrite produces a potent vasorelaxation in human coronary arteries and transplanted coronary artery bypass grafts. *Circ. Res.*, 86: 1619, 1992.
- KÜHNAU, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 24: 117-191, 1976.
- LANG, D.; LEWIS, M.J. Endothelium-derived relaxing factor inhibits the formation of inositol trisphosphate by rabbit aorta. *J. Physiol.*, 411: 45-52, 1989.
- LANZA, F.; BERETZ, A.; STIERLE, A.; CORRE, G.; CAZENAVE, J.P. Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors prevent aggregation of human platelets by raising cyclic AMP and reducing cytoplasmic free calcium mobilization. *Thrombosis Res.*, 45: 477-484, 1987.
- LAUGHTON, M.J.; EVANS, P.J.; MORONEY, M.A.; HOULT, J.R.S.; HALLIWELL, B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacol.*, 42: 1673-1681, 1991.
- LAWSON, D.L.; MEHTA, J.L.; SALDEEN, K.; MEHTA, P.; SALDEEN, T.G.P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment endothelium-dependent vasorelaxation by enhanced release of EDRF and vasodilator prostaglandins. *Eicosanoids*, 4: 217-223, 1991.
- LEFROY, D.C.; CRAKE, T.; UREN, N.G.; DAVIES, G.J.; MASERI, A. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans. *Circulation*, 88: 43-54, 1993.
- LIDBURY, P.S.; THIEMERMANN, C.H.; KORBUT, R.; VANE, J.R. Endothelins release tissue plasminogen activator and prostanoids. *Eur. J. Pharmacol.*, 186: 205-212, 1990.
- LIKE, A.A.; ROSSINI, A.A. Streptozotocin induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*, 193: 415-417, 1976.
- LINCOLN, T.M. Effects of nitroprusside and 8-bromo-cyclic GMP on the contractile activity of the rat aorta. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 224: 100-107, 1983.

- LINDER, L.; KIOWSKI, W.; BUHLER, F.R.; LUSCHER, T.F. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo: blunted responses in essential hypertension. *Circulation*, 81: 1762-1767, 1990.
- MAGGI, C.A.; GIACHETTI, A.; DEY, R.D.; SAID, S.I. Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol. Rev.*, 75: 277-322, 1995.
- MARÍN, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, M.A. Nitric oxide, oxygen-derived free radicals and vascular endothelium. *J. Auton. Pharmacol.*, 15: 279-307, 1995.
- MARÍN, J.; SÁNCHEZ-FERRER, C.F. Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular responses. *Gen. Pharmac.*, 21: 575-587, 1990.
- MARTIN, W.; VILLANI, F.M.; JOTHIANANDAN, D.; FURCHGOTT, R.F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 232: 708-715, 1985.
- MASAKI, T.; VANE, J.; VANHOUTTE, P. International Union of Pharmacology nomenclature of endothelin receptors. *Pharmacol. Rev.*, 46: 137-142, 1994.
- MAYER, B. Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases. In: *Nitric Oxide in the Nervous System*. Academic Press, 1995.
- MCCALL, T.; VALLANCE, P. Nitric oxide takes centre-stage with newly defined roles. *Trends Pharm. Sci.*, 13: 1-6, 1992.
- MIRSALIKHOVA, N.M.; PAKUDINA, Z.P. Flavonoid inhibitors of Na-K-dependent ATPase. *Khim. Prir. Soedin.*, 1: 44-46, 1977.
- MOLNAR, M.; HERTELENDY, F. Signal transduction in rat myometrial cells: comparison of the actions of endothelin-1, oxytocin and prostaglandin F<sub>2α</sub>. *Eur. J. Endocrinol.*, 133: 464-474, 1995.
- MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.R. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an instable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263: 663-665, 1976.

- MONCADA, S. Nitric oxide. *J. Hypert.* 12: 535-539, 1994.
- MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.*, 9: 1319-1330, 1995.
- MONCADA, S.; RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J. Endothelium-derived relaxing factor. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2495-2501, 1988.
- MOORE, P.K.; AL-SWAYEGM O.A.; CHONG, N.W.S.; EVANS, R.A.; GIBSON, A. L-N<sup>G</sup>-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 99: 408-412, 1990.
- MORGAN, R.O.; NEWBY, A.C. Nitroprusside differentially inhibits ADP-stimulated calcium influx and mobilization in human platelets. *Biochem. J.*, 258: 447-454, 1989.
- MORONEY, M.A.; ALCARAZ, M.J.; FORDER, R.A.; CAREY, F.; HOULT, J.R.S. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.*, 40: 787-792, 1988.
- MUGGE, A.; ELWELL, J.H.; PETERSON, T.E.; HARRISON, D.G. Release of intact endothelium-derived relaxing factor depends on endothelial superoxide dismutase activity. *Am. J. Physiol.*, 260: C219-C225, 1991.
- MYARA, I.; PICO, I.; VEDIE, B.; MOATTI, N. A method to screen for the antioxidant effect of compounds on low-density lipoprotein: illustration with flavonoids. *J. Lipid Res.*, 32: 69-73, 1993.
- NAKANE, M.; MITCHELL, J.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180: 1396-1402, 1991.
- NATHAN, C.; XIE, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 269: 13725-13728, 1994.
- NÈGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Rad. Biol. Med.*, 12: 101-106, 1992.

- NELSON, M.T.; PATLAK, J.B.; WORLEY, J.F.; STANDEN, N.B. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am. J. Physiol.*, 259: C3-C18, 1990.
- NEVES, L.J.; DONATO, A.M. Contribuição ao estudo de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). *Bradea*, 5: 275-284, 1989.
- OHGUSHI, M.; KUGIYAMA, L.; FUKUNAGA, K. Protein kinase C inhibitors prevent impairment of endothelium dependent relaxation by oxidatively modified LDL. *Arterioscler. Thromb.*, 13: 1525-1532, 1993.
- OLIVEIRA, F.; SAITO, M.L. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento do diabetes. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2/4: 179-196, 1989.
- ORMANDY, G.C.; JOPE, R.S. Sodium nitroprusside and guanosine 3', 5'-monophosphate (cyclic GMP) inhibit stimulated phosphoinositide liydrolysis in rat cerebral cortical slices. *Neurosci. Lett.*, 100: 287-291, 1989.
- OTSUJI, S.; NAKAJIMA, O.; WAKU, S.; KOJIMA, S.; HOSOKAWA, H.; KINOSHITA, I.; OKUBO, T.; TAMOTO, S.; TAKADA, K.; ISHIHARA, T.; OSAWA, N. Attenuation of acetylcholine-induced vasoconstriction by L-arginine is related to the progression of atherosclerosis. *Am. Heart. J.*, 129: 1094-1100, 1995.
- OYAMA, Y.; KAWASKI, H.; HATTORI, Y.; KANNO, M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 131: 75-78, 1986.
- PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factos. *Nature*, 327: 524-526, 1987.
- PANZA, J.A.; QUYYMI, A.A.; BRUSH, J.E.; EPSTEIN, S.E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N. Engl. J. Med.*, 323: 22-27, 1990.
- PEPATO, M.T.; OLIVEIRA, J.R.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin diabetic rats. *Diabetes Res.*, 22: 49-57, 1993.



- PHILLIPPE, M. The relationship between oxytocin, phosphoinositide-specific phospholipase C and phasic myometrial contractions. *J. Soc. Gynecol. Invest.*, 1: 49-54, 1994.
- PIEPER, G.M.; MEI, D.A.; LANGENSTROE, P. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. *Am. J. Physiol.*, 263: 676-680, 1992.
- PIO-CORREA. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro : Imprensa Nacional, 1984.
- POPESCU, L.M.; PANOIU, C.; HINESCU, M.; NUTU, O. The mechanism of cGMP-induced relaxation in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.*, 197: 393-394, 1985.
- PUPO, A.A. Diagnóstico e classificação do diabetes. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 32: 194-196, 1988.
- QUAST, U. Do the  $K^+$  channel openers relax smooth muscle by opening  $K^+$  channels. *Trends Pharm. Sci.*, 14: 332-337, 1993.
- QUINN, A.C.; PETROS, A.J.; VALLANCE, P. Nitric oxide: an endogenous gas. *Br. J. Anaest.*, 74: 443-451, 1995.
- QUYYUMI, A.; DAKAK, N.; ANDREWS, N.P.; HUSAIN, S.; ARORA, S.; GILLIGAN, D.M.; PANZA, J.A.; CANNON III, R.O. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. *J. Clin. Invest.*, 95: 1747-1755, 1995.
- RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 87: 5193-5197, 1990.
- RAHMAN, A.U.; ZAMAN, K. Medicinal plants with hypoglycaemic activity. *J. Ethnopharmacol.*, 26: 1-55, 1989.
- RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M.L.; NADKARNI, M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC - 37917). *Cancer Chemother. Rep.*, 29: 91-98, 1963.
- RAMANATHAN, L.; DAS, N.P. Studies on the control of lipid oxidation in ground fish by some polyphenolic natural products. *J. Agr. Food. Chem.*, 40: 17-21, 1992.

- RANDALL, M.D.; GRIFFITH, T.M. Differential effects of L-arginine on the inhibition by  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine ester of basal and agonist-stimulated EDRF activity. *Br. J. Pharmacol.*, 104: 473-479, 1991.
- RAPOPORT, R.M. Cyclic guanosine monophosphate inhibition of contraction may be mediated through inhibition of phosphatidylinositol hydrolysis in rat aorta. *Circ. Res.*, 48: 407-410, 1986.
- RAPOPORT, R.M.; DRAZNIN, M.B.; MURAD, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic cGMP dependent protein phosphorylation. *Nature*, 306: 174-176, 1983.
- RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*, 52: 352-357, 1983.
- RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. Cyclic AMP may produce vascular relaxation by inhibition of inositol trisphosphate generation in rat aorta. *Circ. Res.*, 61: 265-272, 1986.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br. J. Pharmacol.*, 96: 418-424, 1989a.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3375-3378, 1989b.
- ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 837-841, 1988.
- ROBBINS, M.J.; SHARP, R.A.; SLONIN, A.E.; BURR, I.M. Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. *Diabetologia*, 18: 55-58, 1980.
- ROMAN-RAMOS, R.; FLORES-SAENZ, J.L.; PARTIDA-HERNANDES, G. Experimental study of the hypoglycaemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Invest. Med.*, 22: 87-93, 1991.
- RUBANYI, G.M. Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Rad. Biol. Med.*, 4: 107-120, 1988.

- RÜCKER, G.; BRASIL-E-SILVA, G.A.A.; BAUER, L.; SCHIKARSKI, M. New constituents of *Stenocalyx michelii*. *Planta Medica*, 31: 322-327, 1977.
- RUSSELL, J.A.; ROHRBACH, M.S. Tannin induced endothelium-dependent contraction and relaxation of rabbit pulmonary artery. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 139: 498-503, 1989.
- RUSO, E.M.K.; REICHEL, A.A.J.; DE-SÁ, J.R.; FURLANETTO, R.P.; MOISÉS, R.C.S.; KASAMATSU, T.S.; CHACRA, A.R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. *Braz. J. Med. Res.*, 23: 11-20, 1990.
- SAENZ DE TEJADA, I.; BLANCO, R.; GOLDSTEIN, I.; KRANE, R.; COHEN, R.A. Cholinergic neurotransmission in human corpus carvenosum: Responses of isolated tissue to nerve stimulation and acetylcholine. *Am. J. Physiol.*, 254: H459-H467, 1988.
- SAENZ DE TEJADA, I.; GOLDSTEIN, I.; AZADZOI, K.; KRANE, R.J.; COHEN, R.A. Impaired neurogenic and endothelium-dependent relaxation of human penile smooth muscle: The pathophysiological basis for impotence in diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1025-1030, 1989.
- SAKURAI, T. YANAGISAWA, M.; MASAKI, T. Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 103-108, 1992.
- SÁNCHEZ-FERRER, C.F.; MARÍN, J. Endothelium-derived contractile factors. *Gen. Pharmac.*, 21: 589-603, 1990.
- SCHLEMPER, V.; CALIXTO, J.B. Nitric oxide pathway-mediated relaxant effect of bradykinin in the guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.*, 111: 83-88, 1994.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.B.; ARIAS, A.R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves, xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 21:183-186, 1987.
- SCHMIDT, H.H.H.W. NO, CO and OH endogenous soluble guanylyl cyclase - activating factors. *FEBS Lett.*, 307: 102-107, 1992.

- SCHMIDT, K.; GRAIER, W.F.; KOSTNER, G.M.; MAYER, B.; KUKOVETZ, W.R. Activation of soluble guanylate cyclase by nitrovasodilators in inhibited by oxydized low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172: 614-619, 1990.
- SCHULZ, R.; TRIGGLE, C.R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15: 255-259, 1994.
- SHAPOVAL, E.E.S.; SILVEIRA, S.M.; MIRANDA, M.L.; ALICE, C.B.; HENRIQUES, A.T. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *J. Ethnopharmacol.*, 44:137-142, 1994.
- SHIMOKAWA H., VANHOUTTE P.M. Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesteremia and atherosclerosis. *Circ. Res.* 64: 900-914, 1989.
- SHOSHAN, V.; MACLENNAN, D.H. Quercetin interaction with Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, 256: 887-892, 1981.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.P. *Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre : UFRGS, 1986.
- SLADEK, S.M.; REGENSTEIN, A.C.; LYKINS, D.; ROBERTS, J.M. Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 169: 1285-1291, 1993.
- SNEDECOR, G. W., COCHRAN, W.G. *Statistical methods*, Ames, Iowa State University Press, 1967.
- SORATA, Y.; TAHAKAMA, U.; KIMURA, M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochem. Biophys. Acta*, 799: 313-317, 1984.
- STEINBERG, D.; PARTHASARATHY, S.; CAREY, T.E.; KHOO, J.C.; WITZTUM, J.L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, 320: 914-924, 1989.

- SWANSTON-FLATT, S.K.; DAY, C.; BAILEY, C.J. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia*, 33: 462-464, 1990.
- SZCZEKLIK, A.; GRYGLEWSKI, R.J. Low-density lipoproteins (LDL) are carriers for lipid peroxides and invalidate prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) biosynthesis in arteries. *Artery*, 7: 488-495, 1980.
- TANAKA, Y.; SHIMIZU, H.; SATO, N.; MORI, M.; SHIMOMURA, Y. Involvement of spontaneous nitric oxide production in the diabetogenic action of streptozotocin. *Pharmacology*, 50: 69-73, 1995.
- TESFAMARIAM, B.; JAKUBOWSKI, J.A.; COHEN, R.A. Contraction of diabetic rabbit aorta due to endothelium-derived PGH<sub>2</sub>, TxA<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol.*, 257: H13273-H13333, 1989.
- THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.B.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. *J. Ethnopharmacol.*, 24: 179-183, 1988.
- THOMAS, G.; RAMWELL, P.W. Interaction of non-arginine compounds with endothelium-derived relaxing factor inhibitor, N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 260: 676-679, 1992.
- TIKKANEN, I.; FYHRQUIST, F. Nitric oxide in hypertension and renal diseases. *Ann. Medic.* 27: 353-357, 1995.
- VAN ACKER, S.A.B.E.; TROMP, M.N.J.L.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214: 755-759, 1995.
- VAN ROSSUM, T.M.; VAN DER BRINK, P.G. Cumulative dose-response curves II. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 413: 299-330, 1963.
- VANHOUTE, P.M. The end of the quest? *Nature*, 327: 459-460, 1987.

- VARGAS, H.M.; CUEVAS, J.M.; IGNARRO, L.J.; CHAUDHURI, G. Comparison of the inhibitory potencies of N<sup>G</sup>-methyl-, N<sup>G</sup>-nitro- and N<sup>G</sup>-amino-L-arginine on EDRF function in the rat: evidence for continuous basal EDRF release. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 257: 1208-1215, 1991.
- VERBEUREN, T.J.; JORDAENS, F.H.; VAN HOVE, C.E.; VAN HOYDONCK, A.-E.; HERMAN, A.G. Release and vascular activity of endothelium-derived relaxing factor in atherosclerotic rabbit aorta. *Eur. J. Pharmacol.*, 191: 173-184, 1990.
- VITA, J.A.; TREASURE, C.B.; NABEL, E.G.; MCLEANANCHAN, J.M.; FISH, R.D.; YEUNG, A.C.; VERKSHTEN, V.I.; SELWYN, A.P.; GANZ, P. Coronary vasomotor response to acetylcholine related to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*, 81: 491-497, 1990.
- WAKABAYASHI, Y.; YAMADA, E.; YOSHIDA, T.; TAKAHASHI, H. Deficiency of endogenous arginine synthesis provokes hypertension by exhausting substrate arginine for nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 1391-1398, 1994.
- WEINER, C.P.; LIZASOAIN, I.; BAYLIS, S.A.; KNOWLES, R.G.; CHARLES, I.G.; MONCADA, S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5212-5216, 1994.
- WEYERSTAHL, P.; MARSHALL-WEYERSTAHL, H.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTMEIN, B.O.; ADEOYE, A.O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Medica*, 54: 546-549, 1988.
- WHALLEY, C.V.; RANKIN, S.M.; HOULT, J.R.; JESSUP, W.; LEAKE, D. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39: 1743-1750, 1990.
- WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Glucose autooxidation and protein modification: The role of oxidative glucosylation in diabetes. *Biochem. J.*, 245: 234-250, 1987.
- WOODMAN, O.L. Modulation of vasoconstrictor by endothelium-derived nitric oxide: the influence of vascular disease. *Clin. Exper. Pharmac. Physiol.*, 22: 585-593, 1995.

- YALLAMPALLI, C.; BYAMSMITH, M.; NELSON, G.; GARFIELD, R.E. Steroid hormones modulates the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology*, 134: 1971-1974, 1994.
- YALLAMPALLI, C.; IZUMI, H.; BYAMSMITH, M.; GARFIELD, R.E. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 170: 175-185, 1993.
- YANG, X.; CAI, B.; SCIACCA, R.R.; CANNON, J.P. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Circ. Res.*, 74: 318-328, 1994.
- YANG, Z.; VON SEGESSER, L.; BAUER, E.; STULZ, P.; TURINA, M.; LUSCHER, T.F. Different activation of the endothelial-L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. *Circ. Res.*, 68: 52-60, 1991.
- ZHANG, J.; SNYDER, S.H. Nitric oxide in the nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 213-233, 1995.
- ZYGMUNT, P.M.; BRUNDEMAR, L.; HÖGESTÄTT, E.D. Endothelium-dependent relaxation resistant to N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine in the rat hepatic artery and aorta. *Acta Physiol. Scand.*, 152: 107-117, 1994.